

**Aus dem Institut für Virologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
und  
der Augenklinik der Universität Leipzig**

**Untersuchungen zur Expression von Interleukin-10 nach  
Transfektion humaner retinaler Pigmentepithelzellen  
und dessen Einfluss auf die Proliferation von T-  
Lymphozyten *in vitro***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig**

**eingereicht von  
Katharina Poschinger  
aus München**

**Leipzig, 2002**

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Hermann Müller  
Institut für Virologie

Prof. Dr. Peter Wiedemann  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde,  
Universitätsklinikum Leipzig

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Müller  
Institut für Virologie

Prof. Dr. Peter Wiedemann  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde,  
Universitätsklinikum Leipzig

Prof. Dr. Johannes Seeger  
Veterinär-Anatomisches Institut

Prof. Dr. Michael Schmidt  
Institut für Immunologie und Molekularbiologie,  
Freie Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 05.11.2002

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Ziel der Arbeit	2
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>13</b>
3.1.1 Chemikalien	13
3.1.2 Zytokine	14
3.1.3 Antikörper	14
3.1.4 Bakterien und Zellen	15
3.1.5 Plasmide	15
3.1.6 Primer	15
3.1.7 Enzyme, Koenzyme und DNA-Längenstandards	16
3.1.8 Vorgefertigte Systeme	16
3.1.9 Medien	17
3.1.10 Lösungen und Puffer	19
<b>3.2 Methoden</b>	<b>21</b>
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
3.2.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	21
3.2.1.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (CIP)	21
3.2.1.3 Reaktion mit Klenow-Enzym	22
3.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese	22
3.2.1.5 Elution von DNA-Fragmenten	23
3.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	23
3.2.1.7 Transformation in superkompetente <i>E.coli</i>	23
3.2.1.8 Quantifizierung von DNA und RNA	23
3.2.1.9 Präparation von Nucleinsäuren	24
3.2.1.9.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	24
3.2.1.9.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	24
3.2.1.9.3 RNA-Präparation	24
3.2.1.10 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	25
3.2.1.10.1 Reverse Transkription	25
3.2.1.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.2.1.11 Transfektion von hRPE-Zellen	26
3.2.1.12 Bestimmung der Transfektionseffizienz	27

3.2.2 Zellbiologische Methoden	28
3.2.2.1 Zellkultivierung	28
3.2.2.2 Immunzytochemische Untersuchungen	29
3.2.2.3 T-Lymphozytenpräparation und Makrophagengewinnung	30
3.2.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl (Viability-Test)	31
3.2.2.5 Nachweis der MHC Klasse II-Expression	31
3.2.2.6 Apoptose-Messung mittels FACS	32
3.2.2.7 Messung des Proteins IL-10 mittels ELISA	33
3.2.2.8 Bestimmung der T-Lymphozytenproliferation mittels MTT-Test	33
3.2.2.9 Hemmung des IL-10 durch Anti-IL-10-Antikörper	34
3.2.3 Statistische Auswertung	35
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1 Konstruktion eines Expressionsvektors für humanes IL-10	36
4.2 Bestimmung des hTERT-RPE1-Zellcharakters	41
4.3 Transfektion von hTERT-RPE1-Zellen und Spender-hRPE-Zellen	42
4.3.1 Testung verschiedener Transfektionsreagenzien	42
4.3.2 Vergleich der Transfektionseffizienzen von hTERT-RPE1-Zellen und Spender-hRPE-Zellen	45
4.3.3 RT-PCR zum Nachweis der IL-10-mRNA	47
4.3.4 ELISA zum Nachweis des Proteins IL-10	48
4.4 Wirkung von IFN- $\gamma$ auf die MHC Klasse II-Expression	50
4.5 Charakterisierung der transfizierten hRPE-Zellen	54
4.5.1 Einfluss der Transfektion mit pCIneoIL-10 auf die Vitalität der hRPE-Zellen	54
4.5.2 Einfluss der Transfektion mit pCIneoIL-10 auf die Apoptose der hRPE-Zellen	55
4.6 Wirkung IL-10-transfizierter hRPE-Zellen auf die T-Lymphozytenproliferation	59
4.6.1 Supprimierung der T-Zellproliferation durch IL-10 ohne APC	59
4.6.2 Supprimierung der T-Zellproliferation durch IL-10 mit APC	61
4.7 Hemmung der IL-10-Wirkung durch Zugabe von Anti-IL-10-Antikörpern	64
<b>5 Diskussion</b>	<b>67</b>
5.1 Ausblick	79
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7 Summary</b>	<b>83</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	<i>antigen presenting cells</i> (antigenpräsentierende Zellen)
ca.	circa
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgebundener Immunabsorptionstest)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
h	Stunde(n)
hRPE-Zellen	humane retinale Pigmentepithelzellen
hTERT-RPE1-Zellen	Telomerase-immortalisierte humane RPE-Zellen
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
min	Minute(n)
n	Anzahl
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SSC	<i>Side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-beta</i> (transformierender Wachstumsfaktor-beta)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
u.	und
U	<i>Units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderem
VE-Wasser	vollentionisiertes Wasser

# 1 Einleitung

Die Gentherapie wird von Fachleuten als Werkzeug der Zukunft angesehen, um angeborene (beispielsweise die erbliche Hypercholesterinämie, Zystische Fibrose/ Mukoviszidose) beziehungsweise erworbene Krankheiten (beispielsweise Tumoren, kardiovaskuläre Erkrankungen) zu bekämpfen. In diesen Fällen soll die Gentherapie benutzt werden, um defekte Gene durch intakte Gene zu ersetzen. Die Übertragung fremder genetischer Information in eukaryonte Zellen, so die Definition der Gentherapie, kann aber auch in anderen Bereichen, wie beispielsweise der Transplantationsmedizin, zu erfolgsversprechenden Ergebnissen führen. Dabei wird in die Zellen ein zusätzliches, fremdes Gen transferiert, dessen Proteinexpression zu veränderten Bedingungen in der Umgebung des Transplantates führen soll.

Bei der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) beispielsweise handelt es sich um eine degenerative Augenerkrankung, die aufgrund der Degeneration von Photorezeptoren zur zentralen Erblindung führt. Dadurch schränkt sie die Lebensqualität der Patienten erheblich ein. Bis heute ist allerdings keine zufriedenstellende Therapie bekannt. Die Transplantation von gesunden retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) in das betreffende Gebiet (Macula lutea) könnte die degenerativen Prozesse verhindern und somit die Sehfähigkeit stabilisieren beziehungsweise verbessern. Die Abstoßungsreaktion, die sowohl im Tiermodell als auch am Patienten beobachtet werden konnte, ist jedoch ein limitierender Faktor. Die Histoinkompatibilität der Spenderzellen führt zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten. Dadurch werden einerseits die antigentragenden Spenderzellen direkt zerstört, andererseits wird durch Freisetzung von Lymphokinen eine Entzündungsreaktion und damit eine Abstoßung der transplantierten Zellen hervorgerufen. Durch Einschleusung der genetischen Information des immunsuppressiven Zytokins Interleukin-10 (IL-10) in gesunde Spender-RPE-Zellen vor der Transplantation wird den Zellen dazu verholfen, ihr therapeutisches Agens, das Protein IL-10, selbst zu synthetisieren. Durch Veränderung der Immunreaktionen im Transplantationsgebiet könnte die Abstoßungsreaktion verhindert werden. Dieser Gedanke liegt der vorliegenden Arbeit zugrunde.

## 1.1 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es zunächst, retinale Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) mit einer nicht-viralen Transfektionsmethode (kationische Lipide) *ex vivo* mit IL-10-DNA zu transfizieren. In einem *in vitro*-Modell, das die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger misst (*mixed lymphocyte-epithelial cell reaction* - MLEC), sollten die Spender-RPE-Zellen mit T-Lymphozyten beziehungsweise T-Lymphozyten plus Makrophagen des Empfängers kokultiviert werden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 2 bis Tag 6) sollte anschließend die T-Zellproliferation quantifiziert werden.



## 2 Literaturübersicht

Die Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) stellt vor allem in den westlichen Industrienationen die Hauptursache der zentralen Erblindung bei Menschen mit einem Alter von mehr als 55 Jahren dar (FERRIS 1983; BRESSLER et al. 1988 a). Verschiedene Risikofaktoren scheinen die Hauptursache für das Auftreten dieser Krankheit zu sein. Neben der Altersabhängigkeit, einer familiären Disposition und einem Mangel an Antioxidantien in der Nahrung sind vor allem Frauen als Zeichen einer bestehenden Geschlechtsdisposition betroffen (MALTZMAN et al. 1979; HYMAN et al. 1983; BRESSLER et al. 1988 a; KLEIN et al. 1992; THE EYE DISEASE CASE CONTROL STUDY GROUP 1992).

Bei der fortgeschrittenen AMD lassen sich zwei klinisch unterschiedliche Krankheitsbilder unterscheiden: die exsudative Form mit choroidaler Neovaskularisation und die überwiegend vorkommende trockene Form (geographische Atrophie) (FERRIS 1983; FERRIS et al. 1984; BRESSLER et al. 1988 a). Beide klinischen Bilder sind überwiegend verbunden mit einem progressiven Verlust der RPE-Zellen im Bereich der Macula lutea, der Stelle des schärfsten Sehens (PENFOLD et al. 1986; BRESSLER et al. 1988 a; SARKS u. SARKS 1994). Die dadurch entstehende fortschreitende zentrale Erblindung bedeutet für die betroffenen Patienten eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität (BRESSLER et al. 1988 a). Bis heute steht keine Therapie mit zufriedenstellenden Langzeitergebnissen zur Verfügung.

Mit Hilfe der Laserkoagulation werden unter Zuhilfenahme verschiedener Laser (Argonlaser, Kryptonlaser) choroidale Neovaskularisationen auf thermischer Basis zerstört. Diese Therapieform verzeichnet zwar positive Erfolge hinsichtlich einer Visuserhaltung oder -verbesserung, die möglicherweise später eintretende Rezidivrate ist jedoch hoch (MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP 1982, 1986 a, b, 1990). Erschwerend kommt hinzu, dass für diese Art der Therapie nur wenige Patienten die notwendigen Kriterien erfüllen: es können lediglich neovaskuläre Membranen behandelt werden, die scharf abgegrenzt sind und demzufolge gut lokalisiert werden können und gleichzeitig extra- oder juxtafoveal gelegen sind (BRESSLER et al. 1987, 1988 b).

Die Photodynamische Therapie, die in den Ländern der Europäischen Union im Jahr 2000 gesetzlich zugelassen wurde (SCHMIDT-ERFURTH u. LAQUA 2001), basiert auf einer nicht-thermischen chemotoxischen Reaktion mit dem Ziel, neo-vaskuläre Gefäße zu verschließen und benachbarte retinale Strukturen (z.B. Photorezeptoren, retinale Gefäße) zu schonen (DONATI et al. 1999; WU u. MURPHY 1999; MICHELS et al. 2000; SCHMIDT-ERFURTH u. LAQUA 2001). Als Photosensibilisator fungiert bei dieser Therapiemethode Verteporfin, ein Wirkstoff der Porphyringruppe (DONATI et al. 1999; FINE 1999; WU u. MURPHY 1999; REGILLO 2000; SCHMIDT-ERFURTH u. LAQUA 2001). Nach intravenöser Applikation reichert sich Verteporfin in der choroidalen Neovaskularisation an (DONATI et al. 1999; MARGHERIO et al. 2000; MICHELS et al. 2000; REGILLO 2000). Durch gezielte Bestrahlung mit einem nicht-thermischen Diodenlaser wird dieser Farbstoff aktiviert, was zu einer Anreicherung von Sauerstoffradikalen führt und damit eine lokale Destruktion der vaskulären Endothelzellen hervorruft (DONATI et al. 1999; FINE 1999; WU u. MURPHY 1999; MARGHERIO et al. 2000; MICHELS et al. 2000; REGILLO 2000; SCHMIDT-ERFURTH u. LAQUA 2001). Die Photodynamische Therapie konnte bisher bei überwiegend abgrenzbaren neovaskulären Membranen mit subfovealer Lage erfolgreich (Visuserhaltung) durchgeführt werden (FINE 1999; MARGHERIO et al. 2000; MICHELS et al. 2000; SCHMIDT-ERFURTH u. LAQUA 2001) ohne schwerwiegende systemische Nebenwirkungen nach sich zu ziehen (DONATI et al. 1999; WU u. MURPHY 1999; REGILLO 2000). Aufgrund einer rasch eintretenden Regeneration im Bereich der Bestrahlungsstelle (3 Monate) wird allerdings eine kostenaufwendige mehrmalige Anwendung erforderlich (DONATI et al. 1999; MARGHERIO et al. 2000; REGILLO 2000), die mit einer Beeinträchtigung des retinalen Pigmentepithels verbunden sein kann (MICHELS et al. 2000). Es wird deutlich, dass vor einer klinischen Routineanwendung der Photodynamischen Therapie in erster Linie solche möglichen unerwünschten Begleiteffekte in Langzeitstudien von wenigstens zwei Jahren sicher ausgeschlossen werden müssen.

Die subretinale Chirurgie ist ein weiterer therapeutischer Ansatz bei der exsudativen Form der AMD (DEJUAN u. MACHEMER 1988; BLINDER et al. 1991; BERGER u. KAPLAN 1992; LAMBERT et al. 1992; THOMAS et al. 1992; HUDSON et al. 1995). Die Erfahrungen speziell auf diesem Gebiet sind bis heute

noch unzureichend. Allerdings gilt die technische Durchführbarkeit, subfoveale Neovaskularisationen innerhalb einer Vitrektomie (Pars plana-Vitrektomie) zu entfernen, als erwiesen. Es sind jedoch postoperative Komplikationen wie beispielsweise das Auftreten einer Katarakt oder einer bakteriellen Endophthalmitis möglich (BERGER u. KAPLAN 1992).

Die Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen, das bedeutet der Ersatz geschädigter alter RPE-Zellen durch gesunde junge Zellen, hat aufgrund der unbefriedigenden beziehungsweise fehlenden Langzeitergebnisse und aufgrund des Auftretens von Nebenwirkungen bereits erwähnter Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. So wurden zunächst anhand verschiedener Tiermodelle die Überlebensdauer und die Funktionalität der transplantierten Zellen erprobt.

Die *Royal College of Surgeons* (RCS)-Ratten entstammen einer Versuchstierlinie, welcher eine retinale Dystrophie angeboren ist (LAVAIL 1981; LOPEZ et al. 1989; LI et al. 1990; LAVAIL et al. 1992; LIN et al. 1996). Die RPE-Zellen sind bei diesen Tieren unfähig, ihre metabolische Funktion, die Außenglieder der Photorezeptoren zu phagozytieren, zu erfüllen. Aufgrund dieser Störung im Zellstoffwechsel vermindert sich die Anzahl an Photorezeptoren (LOPEZ et al. 1989; LI et al. 1990; SHEEDLO et al. 1991; LAVAIL et al. 1992; LIN et al. 1996). Durch eine Transplantation von gesunden RPE-Zellen jedoch degenerieren die in der Nachbarschaft der Transplantate gelegenen Photorezeptoren nicht (LI u. TURNER 1988 a; GOURAS et al. 1989; LOPEZ et al. 1989; LI et al. 1990; LAVAIL et al. 1992; YAMAMOTO et al. 1993; LIN et al. 1996) und weisen zudem eine normale Struktur auf (SHEEDLO et al. 1989; LI et al. 1990; SHEEDLO et al. 1991; LAVAIL et al. 1992; YAMAMOTO et al. 1993; JIANG u. HAMASAKI 1994). Die Transplantation von RPE-Zellen führte bei den RCS-Ratten also zu einer Korrektur des genetischen Defektes (GOURAS et al. 1989). Damit konnte eine bedeutende Rolle der RPE-Zellen in der Funktionserhaltung der Retina nachgewiesen und der Grundstein für eine mögliche Therapie der retinalen Degeneration gelegt werden.

Allogene Transplantationen wurden im Tiermodell beispielsweise mit Kaninchen durchgeführt, die Transplantate wurden jedoch nach 6 Monaten abgestoßen

(CRAFOORD et al. 1999). In einem Rattenmodell lag die Transplantatpersistenz zwischen 1 und 3 Monaten (LI u. TURNER 1988 b).

Xenogene Transplantationen von humanen RPE-Zellen in den Subretinalraum von Primaten und Kaninchen verliefen ebenfalls erfolgreich, aber lediglich innerhalb eines definierten Zeitraumes. Die Transplantate wurden beim Kaninchen nach 1 Monat (SHENG et al. 1995) beziehungsweise nach 3 Monaten (HE et al. 1993) abgestoßen, während die Transplantatpersistenz bei den Primaten bei 3 Monaten (SHENG et al. 1995) beziehungsweise bei 6 Monaten (BERGLIN et al. 1997) lag.

Transplantationen von humanen RPE-Zellen in den Subretinalraum von Patienten mit fortgeschrittener AMD konnten zwar technisch erfolgreich durchgeführt werden, wiesen aber nach 3 Monaten (exsudative AMD) (ALGVERE et al. 1994; GOURAS u. ALGVERE 1996; ALGVERE et al. 1997, 1999) beziehungsweise nach 6 bis 20 Monaten (trockene AMD) (GOURAS u. ALGVERE 1996; ALGVERE et al. 1997, 1999) Anzeichen einer Abstoßungsreaktion auf.

Dies verdeutlicht, dass zwar die Transplantation von RPE-Zellen einen zukunfts-trächtigen Therapieansatz darstellt, die Transplantatabstoßung jedoch die Anwendung im klinischen Bereich zum gegenwärtigen Zeitpunkt wesentlich einschränkt. Die dauerhafte Einbindung des allogenen Transplantates in einen fremden Organismus wird durch das Immunsystem des Empfängers verhindert. Die Barriere für eine erfolgreiche Transplantation stellt somit die Histoinkompatibilität des fremden Gewebes dar. Verantwortlich sind dafür die sogenannten *Major*-Histokompatibilitäts-Antigene (MHC-Antigene) der Klassen I und II. Während sich die MHC-Antigene der Klasse I auf beinahe allen kernhaltigen Zellen befinden, sind diejenigen der Klasse II lediglich den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems vorbehalten (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen). Bei beiden Antigen-Klassen handelt es sich um Glykoproteine, die sich auf der Zelloberfläche der jeweiligen Zellen befinden (LECHLER et al. 1995).

Ob andere Antigene wie *Minor*-Histokompatibilitäts-Antigene eine zusätzliche Rolle bei dem Prozess der Transplantatabstoßung spielen, ist immer noch ungeklärt (LECHLER et al. 1995; KOHEN et al. 1997).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Transplantat-Abstoßungsreaktion sind die T-Lymphozyten, die Fremd-Antigene nur dann erkennen und darauf reagieren können, wenn diese an die jeweiligen MHC-Moleküle gebunden sind. Dabei erkennen zytotoxische T-Zellen Antigene in Verbindung mit MHC-Proteinen der Klasse I, die T-Helferzellen reagieren lediglich auf Fremd-Antigene, wenn diese mit MHC-Molekülen der Klasse II assoziiert sind (SINGER u. BACH 1995).

Retinale Pigmentepithelzellen sind jedoch in der Lage, neben MHC-Antigenen der Klasse I auch diejenigen der Klasse II zu exprimieren (ZAVAZAVA et al. 1991, OSUSKY et al. 1997). Zusätzlich können RPE-Zellen unter Einfluss des immunregulatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  diese Moleküle auf ihrer Zelloberfläche vermehrt exprimieren (DETRICK et al. 1985, 1986; LIVERSIDGE et al. 1988 a, b; BAUDOUIN et al. 1990; PERCOPO et al. 1990; GABRIELIAN et al. 1994; KOHEN et al. 1997; ENZMANN et al. 1998 a, 1999 b; CASELLA et al. 1999). Somit gehören die retinalen Pigmentepithelzellen neben der retinalen Mikroglia zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Auges (BARRON 1995).

Das retinale Pigmentepithel liegt zwischen der Choriokapillaris und der sensorischen Retina. Es bildet eine einfache Schicht aus isoprismatischen Zellen, die mit ihrer Basalmembran der Bruch'schen Membran aufliegen und mit der mikrovillibesetzten apikalen Seite in die Außenglieder der Stäbchen und Zapfen hineinragen (HOLLYFIELD u. WITKOVSKY 1974; ZINN u. BENJAMIN-HENKIND 1979). Neben der Absorption von Streulicht und einer nutritiven Funktion liegt die Hauptaufgabe der RPE-Zellen in der Phagozytose von gealterten Photorezeptoraußensegmenten und sind somit unentbehrlich für die Erhaltung der neuralen Retina (HOLLYFIELD u. WITKOVSKY 1974; ZINN u. BENJAMIN-HENKIND 1979; BOK 1985).

RPE-Zellen produzieren außerdem Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF- $\beta$ , das ebenfalls einen positiven Einfluss auf die sensorische Retina ausübt (CAMPOCHIARO 1993; TANIHARA et al. 1993; HOLLBORN et al. 2000 a) sowie Chemokine und Zytokine wie RANTES (*regulated on activation normal T cell expression and secreted chemokine*) (CAMPOCHIARO 1993; HOLTKAMP et al. 1998; ENZMANN et al. 1999 a; HOLLBORN et al. 2000 a), MCP-1 (*monocyte*

*chemotactic protein-1*), IL-8 (CAMPOCHIARO 1993; ELNER et al. 1997; HOLTKAMP et al. 1998; ENZMANN et al. 1999 a; HOLLBORN et al. 2000 a) und IL-15 (KUMAKI et al. 1996, HOLLBORN et al. 2000 a). Das ebenfalls von RPE-Zellen synthetisierte IL-6 (BENSON et al. 1992; ELNER et al. 1992; PLANCK et al. 1992; HOLTKAMP et al. 1998) gilt auch als Abstoßungsmarker, dessen Bedeutung bisher bei Leber- und Nierentransplantationen beschrieben wurde (BOROS et al. 1997; DIPAOLO et al. 1997). Die RPE-Zellen exprimieren zudem verschiedene Rezeptoren, beispielsweise für IL-15 (KUMAKI et al. 1996), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (SIPPY et al. 1995). Durch Freisetzung von Mediatoren und zusätzliche Expression von Rezeptoren können RPE-Zellen auf fremde Signale reagieren und besitzen außerdem die Möglichkeit der Autoregulation.

Das Auge gehört neben Gehirn, Ovar, Uterus (fetoplazentarer Teil), Hoden, Schilddrüse und Leber zu den immunprivilegierten Organen (BARKER u. BILLINGHAM 1977; STREILEIN et al. 1992; STREILEIN 1996). Dies erklärt die Tatsache, dass die Überlebensdauer von Transplantaten in diesen Bereichen des Organismus höher ist als in nicht-privilegierten Regionen des Körpers (JIANG u. STREILEIN 1990/1991, 1992; JIANG et al. 1993; GRISANTI et al. 1997). Im Auge ist dieses Phänomen von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung des physiologischen Milieus, da eine Verschlechterung des Sehvermögens oder sogar eine Erblindung aus einer einfachen entzündlichen Reaktion resultieren würde (STREILEIN et al. 1992).

Das Immunprivileg des Auges, insbesondere der Vorderkammer, existiert vor allem wegen des sogenannten ACAID-Phänomens (*anterior chamber-associated immune deviation*). Darunter wird eine Verminderung von Immunantworten aufgrund der Bildung antigenspezifischer T-Suppressorzellen verstanden, die die für die verzögerte Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktion verantwortlichen T-Zellen zurückhalten und die Bildung komplementfixierender Antikörper durch B-Zellen vermindern (STREILEIN u. NIEDERKORN 1985; NIEDERKORN 1990; COUSINS et al. 1991; WILBANKS et al. 1991; STREILEIN et al. 1992; STREILEIN 1996).

Im Rahmen einer Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktion wird das Antigen durch antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise Makrophagen, zu nahegelege-

nen Lymphknoten transportiert und dort in Kontakt mit T-Lymphozyten gebracht. Spezifische Lymphozyten erkennen das Antigen, proliferieren (klonale Expansion) und differenzieren sich. Dabei differenzieren sich T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die die antigentragenden Zielzellen direkt zerstören können und zu einer weiteren Gruppe von T-Zellen, den sogenannten T-Helferzellen. Diese rufen durch Freisetzung von Lymphokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine antigenspezifische, lokalisierte Entzündungsreaktion hervor und vermitteln auf diese Weise die Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktion (STREILEIN et al. 1992; STREILEIN 1996).

Unterstützt wird das ACAID durch FasL (FasLigand), einem Glykoprotein mit einer Größe von 40 kDa, das von den RPE-Zellen gebildet werden kann. Es führt nach dessen Freisetzung zur Apoptose derjenigen T-Lymphozyten, die den entsprechenden Rezeptor (Fas) besitzen (GRIFFITH et al. 1995; GRIFFITH u. FERGUSON 1997; STREILEIN et al. 1997; JORGENSEN et al. 1998).

Das Immunprivileg gilt eingeschränkt auch für den Subretinalraum, dem bei der Transplantation von RPE-Zellen die größte Bedeutung zukommt. Als eine sozusagen mechanische Barriere für Entzündungszellen gilt hier die Blut-Retina-Schranke (JIANG et al. 1993). Hinzu kommt die Fähigkeit retinaler Pigmentepithelzellen, immunsuppressive Zytokine wie beispielsweise TGF- $\beta$  zu synthetisieren und in den Subretinalraum abzugeben (COUSINS et al. 1991; TANIHARA et al. 1993). Das Immunprivileg des Subretinalraumes ist nicht absolut, sondern unterliegt vielmehr einem dynamischen physiologischen Prozess (JIANG u. STREILEIN 1990/ 1991, 1992; JIANG et al. 1993; GRISANTI et al. 1997; CRAFOORD et al. 1999). Dieser Prozess konnte anhand eines Kaninchenmodells beobachtet werden (CRAFOORD et al. 1999); in den Subretinalraum transplantierte RPE-Zellen (allogene Transplantation) unterlagen nach 6 Monaten einer Abstoßungsreaktion, die sich in einer Schrumpfung des Transplantates und Depigmentierung der transplantierten Zellen darstellte. Desweiteren wurden vermehrt Makrophagen im Subretinalraum beobachtet (CRAFOORD et al. 1999).

Eine wirksame Methode, einer Transplantatabstoßung vorzubeugen, ist eine medikamentell hervorgerufene systemische Immunsuppression durch kombinierte Anwendung von Methylprednisolon, Azathioprine und Zyklosporine, die auch am

Auge Wirksamkeit zeigt (SOOTS et al. 1998). Durch Applikation entsprechender Pharmaka wird dabei unspezifisch die Anzahl der T-Lymphozyten gesenkt. Da die Nebenwirkungen, wie beispielsweise Nephrotoxizität, Hepatotoxizität und Hypertension jedoch nicht unerheblich sind (BELIN et al. 1990), erscheint ein Einsatz angesichts der Tatsache, dass es sich beim Auge um kein lebensnotwendiges Organ handelt, ethisch überdenkenswert.

Die bereits erwähnte MHC Klasse II-Expression auf der Oberfläche der RPE-Zellen ist eine der Grundvoraussetzungen für die Einleitung einer Transplantatabstoßung. Aufgrund dieser Tatsache können die mit den MHC Klasse II-Molekülen assoziierten Antigene der transplantierten RPE-Zellen zunächst von den Empfänger-T-Helferzellen erkannt werden. Im Anschluss daran sezernieren diese IL-2 und führen somit unter anderem zu einer T-Zellklonbildung (klonale Expansion), wobei auch die Anzahl der zytotoxischen T-Lymphozyten zunimmt (BLUESTONE u. LECHLER 1995; SINGER u. BACH 1995). Durch Freisetzung zytolytischer Faktoren verändert sich die Membranpermeabilität und die transplantierten Zellen werden schließlich zerstört (ENZMANN et al. 1999 a). Nach der Phagozytose der Zellreste durch APC werden die Antigene präsentiert und sind somit den Lymphozyten zugänglich. Die Immunreaktion wird in Gang gebracht.

Desweiteren führt das Operationstrauma bei einer Transplantation zu einer Aktivierung der Mikroglia, die mit einer Freisetzung von IL-1 und TNF- $\alpha$  reagieren (ALTMAN 1994; KOHEN et al. 1997). Unter Einfluss von IL-1 werden T-Lymphozyten aktiviert und die Sekretion von IL-2 ausgelöst. Dadurch werden die T-Zellen in ihrer Anzahl erhöht (KOHEN et al. 1997; TUYT et al. 1997). Durch die Einwirkung von TNF- $\alpha$  werden MHC Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche von RPE-Zellen vermehrt exprimiert und retinale Pigmentepithelzellen zusätzlich stimuliert (KOHEN et al. 1997; ENZMANN et al. 1999 b; HOLLBORN et al. 2000 a). Als Folge davon sezernieren die RPE-Zellen wiederum verschiedene Mediatoren (siehe oben). Dies führt zusammen mit den präsentierten Antigenen der zerstörten transplantierten Zellen zu einem Aufschaukeln der Abstoßungsreaktion.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz scheint also eine Verminderung dieser auf der Oberfläche der RPE-Zellen exprimierten Glykoproteine zu sein. Eine sich daraus



ergebende lokale Immunsuppression (SUZUKI et al. 1995) kann erreicht werden durch Einsatz immunsuppressiver Zytokine, wie beispielsweise IL-10 und TGF- $\beta$ . Positive Ergebnisse liegen anhand von *in vitro*-Versuchen, in denen RPE-Zellen abwechselnd mit beiden Zytokinen inkubiert wurden, bereits vor: die Zellen zeigten eine Verminderung der MHC Klasse-II-Expression (BOORSTEIN et al. 1997; ENZMANN et al. 1999 b).

IL-10 besitzt immunsuppressive Wirkungen auf T-Lymphozyten und APC. Dieses Zytokin hemmt die IFN- $\gamma$ -Synthese und verhindert somit eine vermehrte MHC Klasse II-Expression. Dadurch wird einerseits die Makrophagenaktivierung, andererseits die Aktivierung der T-Lymphozyten verhindert (DEWAAL-MALEFYT et al. 1991 b).

TGF- $\beta$  hat ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften. Durch eine Verhinderung der Differenzierung von T-Lymphozyten in zytokinproduzierende T-Helferzellen wird, ähnlich wie bei einer Einwirkung mit IL-10, eine IFN- $\gamma$ -induzierte MHC Klasse II-Expression herabgesetzt (ESPEVIK et al. 1987; CZARNIECKI et al. 1988; LUCAS et al. 1991; CLARK u. COKER 1998; WEI u. JONAKAIT 1999). Außerdem wird durch TGF- $\beta$  eine Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten verhindert (WAHL et al. 1989; RODLAND et al. 1990; COUSINS et al. 1991; LUCAS et al. 1991; CLARK u. COKER 1998). Es wurden jedoch Zusammenhänge zwischen der Augenerkrankung Proliferative Vitreoretinopathie (PVR) und erhöhten TGF- $\beta$ -Werten beschrieben (CONNER et al. 1989; WELLER et al. 1990; LIMB et al. 1991; WIEDEMANN 1992).

Neben der intraokulären Injektion von IL-10 und einer Vorbehandlung des Transplantates *ex vivo* stellt die Gentherapie eine Interventionsmöglichkeit dar. Durch *ex-vivo*-Transfer von Genen in betreffende Spender-RPE-Zellen (Transfektion) wird ein gezieltes Einbringen des immunsuppressiven Interleukins IL-10 an den Ort der Transplantation ermöglicht. Dadurch können Nebenwirkungen, die in Zusammenhang mit einer systemischen Immunsuppression stehen, vermindert werden. Zahlreiche Methoden für die Transfektion stehen bereits zur Verfügung, wie beispielsweise die Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran-Methode, die Kalziumphosphat-Präzipitation, die Elektroporation, kationische Lipide, aktivierte Dendri-

mere und die Verwendung viraler Vektoren. Die Effizienz der transfizierten Zellen bei den unterschiedlichen Methoden und Zellen schwankt jedoch zum Teil erheblich (10 % bis annähernd 100 % - MULLIGAN 1993; QIN et al. 1994).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Aceton	J.T. Baker, Niederlande
Agarose (SeaKem Le)	FMC Bioproducts, Rockland/USA
Blue/Orange 6x Loading Dye	Promega, Madison/USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid (DMF)	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Dodecylformamid Na-Salz (SDS)	Serva, Heidelberg
Dodecylsulfat Na-Salz	Serva, Heidelberg
EDTA	Serva, Heidelberg
Effectene <sup>®</sup> , Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	BioRad, München
Ficoll-Paque <sup>®</sup> (Research Grade)	Pharmacia Biotech, Uppsala/ Schweden
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt
FuGENE <sup>®</sup> 6, Transfektionsreagenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Gelafusal-N	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Gentamicin	Ratiopharm, Ulm
Glutaraldehyd	Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz
Glyzerol-Gelatine	Sigma, St. Louis/USA
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] x 3 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Roth, Karlsruhe
Laminin, Maus	BectonDickinson, Heidelberg

L-Broth-Agar-Kapseln	Bio 101, Joshua Way/USA
L-Broth-Kapseln	Bio 101, Joshua Way/USA
Methanol	J.T. Baker, Niederlande
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Mitomycin C (von <i>Streptomyces caespitosus</i> )	Sigma, St. Louis/USA
3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl- 2H-Tetrazolium Bromid (MTT)	Serva, Heidelberg
NaCl 0,9 %	Gibco BRL, Eggenstein
NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	Gibco BRL, Eggenstein
NH <sub>4</sub> Cl	Serva, Heidelberg
N,N-Dimethylformamid	Sigma, St. Louis/USA
Phythämagglutinin (PHA)	Murex, Dartford/England
SuperFect <sup>®</sup> , Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Tris	Serva, Heidelberg
Trizol <sup>®</sup> Reagent	Gibco BRL, Eggenstein
Trypanblau 0,5 %	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco BRL, Eggenstein
Tween 20	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Ziege-Normalserum	DAKO, Glostrup/Dänemark

### 3.1.2 Zytokine

rekombinantes humanes IFN- $\gamma$	Genzyme, Cambridge/USA
-------------------------------------	------------------------

### 3.1.3 Antikörper

Anti-Human Interleukin-10, polyklonaler Antikörper (Schaf)	Endogen, Cambridge/USA
Anti-Human Keratin (LP 34), monoklonaler Antikörper (Maus)	DAKO, Glostrup/Dänemark
Anti-MHC Klasse II (I2-RD1), monoklonaler Antikörper (Maus)	Coulter, Miami/USA

### 3.1.4 Bakterien und Zellen

*E.coli*-Stamm:

JM 109

Promega, Madison/USA

Genotyp:

recA1, supE44, endA1,  
hsdR17, gyrA96, relA1, thi,  
 $\Delta$ (lac-proAB), F'(traD36,  
proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>, lacZ $\Delta$ M 15)

Telomerase-immortalisierte humane RPE-Zellen (hTERT-RPE1-Zellen)

Clontech, Miami/USA

humane RPE-Zelllinie 1 (Spender: w, 16 Jahre), 2 (Spender: m, 21 Jahre) und  
3 (Spender: m, 39 Jahre)

Zelllabor der Universitäts-  
Augenklinik Leipzig

### 3.1.5 Plasmide

pCIneo

Promega, Madison/USA

pCIneoLacZ

Labor der Universitäts-  
Augenklinik Leipzig

pH15C

ATCC, Manassas/USA

### 3.1.6 Primer

humaner IL-10-sense-Primer

5' CAGTTTTACCTGGAGGAG 3'

humaner IL-10-antisense-Primer

5' CAATAAGGTTTCTCAAGGGGCTGGGTC 3'

humaner  $\beta$ -actin-sense-Primer

5' ATGGCCACGGCTGCTTCCAGC 3'

humaner  $\beta$ -actin-antisense-Primer

5' CATGGTGGTGCCGCCAGACAG 3'

Alle Primer wurden freundlicherweise von Dr. U. Wagner, Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt.

### 3.1.7 Enzyme, Koenzyme und DNA-Längenstandards

DNA-Ladder (100/1000bp)	Promega, Madison/USA
kb DNA-Marker	Pharmacia Biotech, Uppsala/ Schweden
Lambda ( $\lambda$ ) DNA-/HindIII-Marker	Promega, Madison/USA
CIP (alkalische Phosphatase)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsendonukleasen:	
<i>HindIII</i> , <i>SmaI</i>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i>	New England BioLabs, Beverly/USA
Reverse Transkriptase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

### 3.1.8 Vorgefertigte Systeme

#### für die Molekularbiologie:

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
GFX <sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Pharmacia Biotech, Uppsala/ Schweden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System	Promega, Madison/USA

für die Zellbiologie:

A n n e x i n

V

F I T C

Immunotek, t

Marseille/Frankreich

humaner IL-10 Quantikine-ELISA-Kit

R&D Systems, Wiesbaden

### 3.1.9 Medien

Medien für *E.coli*:

LB-Medium hergestellt aus L-Broth-Kapseln:

In einen 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden zwei L-Broth-Kapseln zu 100 ml VE-Wasser gegeben und bei 121°C 15 min lang autoklaviert.

Zusammensetzung pro Liter VE-Wasser:

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
pH 7,4	

Ampicillinstammlösung (30 mg/ml) wurde zu einer Endkonzentration von 90 µg/ml zugesetzt.

LB-Platten hergestellt aus L-Broth-Agar-Kapseln:

In einen 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden acht L-Broth-Agar-Kapseln zu 250 ml VE-Wasser gegeben und bei 121°C 15 min lang autoklaviert. Nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 50°C wurde eine geeignete Menge davon in Kulturplatten gegossen und bei 15 bis 30°C gelagert.

Zusammensetzung pro Liter VE-Wasser:

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
Agar	15,0 g
pH 7,4	

SOC (*super optimal catabolic* - HANAHAN 1983)-Medium (pro 100 ml VE-Wasser):

Trypton	2,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl (1 M)	1,0 ml
KCl (1 M)	0,25 ml
Mg <sup>2+</sup> (2 M) Stammlösung	1,0 ml
Glukose (2 M; autoklaviert)	1,0 ml
pH 7,0	

Mg<sup>2+</sup> (2 M) Stammlösung (100ml) aus 20,33 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O und  
24,65 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

#### Medien für Zellkultur:

Dulbecco's modified eagle medium, DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)

Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham (Sigma, St. Louis/USA)

450 ml ergänzt mit:

FKS	50 ml
Glutamin	5 ml
Natrium Bikarbonat (7,5%)	17,3 ml
Gentamicin	500 µl

Nutrient mixture F-10 (Ham) with Glutamax-I (Gibco BRL, Eggenstein)

450 ml ergänzt mit:

FKS	50 ml
Gentamicin	500 µl

RPMI 1640 Medium with Glutamax-II (Gibco BRL, Eggenstein)



### 3.1.10 Lösungen und Puffer

#### für die Molekularbiologie:

DEPC-Wasser für Arbeiten mit RNA:

DEPC wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) mit VE-Wasser verdünnt und 2 Stunden lang unter mehrmaligem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und autoklaviert.

DEPC bewirkt durch eine Histidin-spezifische Alkylierung von Enzymen eine Inaktivierung von RNAsen. Durch das Autoklavieren wird das DEPC in der Lösung zersetzt, da ansonsten eine Vernetzung von RNA-Molekülen auftritt.

Färbelösung (pro 250 ml PBS):

$K_3Fe(CN)_6$	329,20 mg
$K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$	422,25 mg
$MgCl_2 \times 6 H_2O$	101,65 mg
pH 7,4	

Unmittelbar vor Gebrauch wurde zu dieser Färbelösung X-Gal-Stammlösung (20 ng/ml) zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben.

Fixierlösung (pro 100 ml PBS pH 7,4):

Formaldehyd	2 % (v/v)
Glutaraldehyd	0,05 % (v/v)

10 x PBS (pro Liter VE-Wasser):

NaCl (137 mM)	80,0 g
$Na_2HPO_4$ (1,4 mM) $\times 2 H_2O$	18,5 g
$KH_2PO_4$	4,3 g
pH 7,4	

50 x TAE (pro Liter VE-Wasser):

Tris	242,0 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100,0 ml

für die Zellbiologie:

Erythrozytenlysepuffer:

VE-Wasser	
NH <sub>4</sub> Cl	0,83 %
Tris	0,017 M
pH 7,5	

FACS-Fixierpuffer:

PBS pH 7,4	
Formaldehydlösung	1 % (v/v)
Gelafusal-N	5 %

FACS-Waschpuffer:

PBS pH 7,4	
Gelafusal-N	5 %
NaN <sub>3</sub>	0,1 %

Immunfluoreszenz-Blockierungspuffer:

TBS pH 7,5	
Gelafusal-N	5 %
Ziege-Normalserum	3 %
Tween 20	1 %

Immunfluoreszenz-Waschpuffer:

TBS pH 7,5	
Gelafusal-N	5 %
Tween 20	1 %

MTT-Stammlösung:

5 mg MTT/ml PBS (pH 7,4)

PBS Dulbecco's (Gibco BRL, Eggenstein)

PBS (*phosphat buffered saline*), pH 7.2 (Gibco BRL, Eggenstein)

TBS (*tris buffered saline*) pH 7,5:

NaCl-Lösung (0,9 %)

Tris 0,1 M

Trypanblaulösung:

0,7 ml Trypanblau/ml NaCl-Lösung (0,9 %)

66 %

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### 3.2.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für einen typischen Restriktionsansatz wurden zu 1 bis 8 µg der eingesetzten DNA und ca. 5 bis 10 U der geeigneten Restriktionsendonuklease zu 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10x -Inkubationspuffers hinzupipettiert und auf ein Endvolumen von 20 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Dieser Ansatz inkubierte für 2 Stunden bis über Nacht bei der für das jeweilige Restriktionsenzym vorgeschriebenen Temperatur.

#### 3.2.1.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (CIP)

Die am 5'-Ende der Vektor-DNA vorhandenen Phosphatreste wurden durch Zugabe von 2 U CIP in einem 20 µl-Restriktionsansatz abgespalten. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte ein nochmaliges Hinzufügen von 2 U CIP mit einer weiteren Inkubation (15 min bei 37°C). Um das sehr stabile Enzym zu denaturieren wurden 4 µl 10 % iges SDS und 3 µl Inkubationspuffer zupipettiert und 15 min bei 75°C inkubiert.

#### 3.2.1.3 Reaktion mit Klenow-Enzym

Die restriktionsbedingten 5'-überhängenden Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Dazu wurden 4 U Klenow-Enzym und 1 µl einer 1 mM dNTP-Lösung zu einem 20 µl-Restriktionsansatz pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C erfolgte die Inaktivierung des Enzyms (10 min bei 75°C).

#### 3.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, nach Plasmidisolierung und im Anschluss an eine PCR wurden Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Diese Gele enthielten in Abhängigkeit der Größe der zu trennenden Fragmente 0,8 % beziehungsweise 1,5 % Agarose.

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gegeben, durch Einsatz eines handelsüblichen Mikrowellengerätes verflüssigt und mit Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 10 ng/ml versetzt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde das noch flüssige Gel in einen Gelträger mit eingesetztem Kamm gegossen. Als Standard dienten sowohl eine mit *HindIII* geschnittene λ-DNA als auch ein 1000 bp-DNA-Marker; zu 4 µl des jeweiligen Standards wurden 3 µl färbender Beladungspuffer (Blue/Orange 6x Loading Dye), zu den 20 µl-Restriktionsansätzen 5 µl des Puffers pipettiert. Nach Aufbringen der Proben auf das Gel wurde an horizontalen Kammern eine Spannung von 90 Volt für 60 bis 90 min angelegt.

Das zupipettierte Ethidiumbromid interkalierte in die DNA, so dass diese unter UV-Licht sichtbar wurde. Die DNA wurde mittels des Geldokumentationssystems Fluor-S Multimager® mit der Software Multi-Analyst® (beides Firma BioRad, München) fotografiert und die Größe der Fragmente durch den Vergleich der verwendeten Längenstandards ausgewertet.

#### 3.2.1.5 Elution von DNA-Fragmenten

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und die DNA laut Gebrauchsanweisung des Herstellers mit dem „GFX<sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ aus dem Gel eluiert.

#### 3.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu ligieren, wurden in einen Ansatz mit einem Volumen von insgesamt 20 µl neben 1 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl 10x -Inkubationspuffer Vektor- beziehungsweise Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 zugegeben (Vektoranteil mindestens 50 ng) und über Nacht bei 16°C inkubiert.

#### 3.2.1.7 Transformation in superkompetente *E.coli*

2 µl aus einer Ligrationsreaktion wurden mit 50 µl zuvor langsam aufgetauter superkompetenter *E.coli*-Zellen gemischt und 20 min auf Eis inkubiert; dadurch konnte die DNA an die Zellwand der Bakterien adhärieren. Nach einem 50-Sekunden dauerndem Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42°C erfolgte eine Inkubation auf Eis für 2 min. Durch die Wärmeeinwirkung wurde die Zellwand für eine anschließende DNA-Einschleusung noch durchlässiger, der plötzliche Temperaturabfall führte wieder zu einer Verminderung der Permeabilität. Daraufhin wurden 950 µl vorgewärmtes SOC-Medium (HANAHAHAN 1983) zugegeben und alles 1,5 Stunden bei 37°C schüttelnd (203 rpm) inkubiert. Danach wurde der Ansatz 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert, ca. 900 µl Überstand abpipettiert und das Zellpellet in den verbleibenden 100 µl anschließend auf eine LB-Platte mit Ampicillin mit Hilfe eines Drigalski-Spatels ausgestrichen. Abschließend inkubierte die Kulturplatte über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 37°C.

#### 3.2.1.8 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch über die Messung der Absorption bei 260 nm gegen Wasser mit Hilfe des Gerätes Gene Quant pro RNA/DNA Calculator<sup>®</sup> der Firma Amersham Pharmacia Biotech,

Cambridge/England. Für die Berechnung der Konzentrationen wurde von folgenden Werten ausgegangen:

OD<sub>260</sub> von 1,0 = 40 µg/ml RNA

OD<sub>260</sub> von 1,0 = 50 µg/ml doppelsträngige DNA

War der Quotient der Extinktionen 260 und 280 nm bei DNA >1,6 und bei RNA >1,8, so konnte von einer reinen Probe ausgegangen werden.

### 3.2.1.9 Präparation von Nukleinsäuren

#### *3.2.1.9.1 Minipräparation von Plasmid-DNA*

2 ml LB-Medium mit Ampicillinlösung wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 203 rpm und 37°C inkubiert. Danach wurde die Bakterien-suspension 7 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellett weiterbehandelt. Nach Einsatz des „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems“ lag reine Plasmid-DNA vor.

#### *3.2.1.9.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA*

Für eine Maxipräparation von Plasmid-DNA wurde zunächst 5 ml LB-Medium mit Ampicillinlösung mit einer Bakterienkolonie einer vorbereiteten Agar-Platte beimpft. Dann wurde der Ansatz ca. 8 Stunden bei 37°C und 203 rpm bebrütet. Aus dieser Starterkultur wurden 200 µl zu 100 ml LB-Medium mit Ampicillinlösung in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 37°C und 203 rpm inkubiert. Diese Kultur wurde anschließend 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ präpariert. Die erhaltene Plasmid-DNA-Menge wurde spektrophotometrisch ermittelt und in TE-Puffer auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl verdünnt bei -20°C gelagert.

#### *3.2.1.9.3 RNA-Präparation*

Die für den Umgang mit RNA notwendigen Pipettenspitzen, Eppendorf-Becher und Zentrifugenbecher wurden doppelt autoklaviert und über Nacht bei 120°C sterilisiert; Glasgefäße wurden 3 Stunden bei 250°C sterilisiert. Alle notwendigen Lösungen wurden mit DEPC-Wasser hergestellt. Zur RNA-Präparation wurden

hTERT-RPE1-Zellen zunächst trypsiniert und zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellett wurde in 500 µl Trizol® resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µl Chloroform in die Eppendorf-Becher pipettiert, kräftig geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 11900 rpm und 4°C erhielt man folgende Phasentrennung: eine obere wässrige Phase mit der RNA, eine mittlere weiße Interphase mit Zellproteinen und eine untere phenolhaltige Phase mit DNA. Die obere Phase wurde in einen neuen Eppendorf-Becher vorsichtig überführt und mit 250 µl Isopropanol gemischt. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert, ebenfalls 10 min bei 11900 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das übrigbleibende gelähnliche RNA-Pellett mit 500 µl 75 %igem Ethanol zweimal gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 9600 rpm und 4°C wurde das Pellett luftgetrocknet, in einer geeigneten Menge DEPC-Wasser gelöst und die Eppendorf-Becher wurden für 10 min bei 63°C inkubiert. Die erhaltene mRNA-Menge wurde mittels Gene Quant® gemessen und für nachfolgende Schritte auf Eis gelagert.

### 3.2.1.10 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

#### *3.2.1.10.1 Reverse Transkription*

RNA wurde zunächst in cDNA mittels „1 st strand cDNA synthesis kit“ umgeschrieben. Dafür wurden 2 µg RNA zu 11,3 µl Master-Mix (bestehend aus 2 µl 10 x-Puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM pro dNTP, 1,6 µg p(dT)<sub>15</sub> Primer, 25 U RNase-Inhibitor, ≥ 20 U AMV-RT) zugegeben und auf ein Endvolumen von 20 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde nach Angaben des Herstellers 10 min bei 25°C zur Primerbindung und 1 Stunde bei 42°C zur cDNA-Synthese im PTC-200-Thermocycler® der Firma MJ Research, Watertown/USA inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion 15 min bei 95°C zur Inaktivierung des Enzyms erhitzt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

#### *3.2.1.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurde der „Taq PCR Master Mix Kit“ verwendet. Zu 2 µl aus der cDNA-Synthese-Reaktion wurden je 0,2 µM der sense- beziehungsweise antisense-Primer sowie 25 µl Master-Mix pipettiert und der Ansatz mit

sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die PCR wurde im PTC-200-Thermocycler® der Firma MJ Research, Watertown/USA, durchgeführt. Folgende Temperaturprofile wurden verwendet:

IL-10 (383 bp)

94°C                      3,0 min (Denaturierung)

35 Zyklen mit jeweils:

94°C                      20 sec

55°C                      1,0 min (Annealing)

72°C                      1,5 min (Synthese)

72°C                      10 min (Schlusszyklus)

β-actin (237 bp)

94°C                      3,0 min (Denaturierung)

35 Zyklen mit jeweils:

94°C                      20 sec

60°C                      1,0 min (Annealing)

72°C                      1,5 min (Synthese)

72°C                      10 min (Schlusszyklus)

#### 3.2.1.11 Transfektion von hRPE-Zellen

hRPE-Zellen wurden ca. 16 Stunden vor der Transfektion ausgesät, um eine ideale Konfluenz von ca. 50 bis 80% zu erreichen. Zur Ermittlung der optimalen Transfektionseffizienz wurden verschiedene Transfektionsreagenzien getestet. Das Transfektionsreagenz FuGENE<sup>®</sup> 6 wurde in einen Eppendorf-Becher zu Zellkulturmedium ohne FKS pipettiert, 5 min bei RT inkubiert und danach die DNA zugegeben. Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses zwischen DNA und FuGENE<sup>®</sup> 6 wurde das vom Hersteller empfohlene Pipettierschema verwendet. Nach einer anschließenden Inkubation von 20 min, ebenfalls bei RT, zur Ausbil-



dung des kationischen Lipid-DNA-Komplexes wurde dieser Komplex zu den Zellen pipettiert, kurz geschüttelt und mindestens 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach konnten die Zellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen weiter verwendet werden.

Für die Transfektion mit SuperFect<sup>®</sup> wurde in einem Eppendorf-Becher zunächst die DNA in FKS-freies Medium gegeben und anschließend das Transfektionsreagenz dazupipettiert. Die Ansätze wurden zur Ausbildung von Lipid-DNA-Komplexen 5 bis 10 min bei RT belassen und danach zu den Zellen gegeben. Auch hier wurde das vom Hersteller empfohlene Pipettierschema zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses zwischen SuperFect<sup>®</sup> und DNA verwendet. Die Zellen wurden mindestens 5 Stunden bei 37°C inkubiert und zur Ermittlung der Transfektionseffizienzen weiter verwendet.

Für die Transfektion mit Effectene<sup>®</sup> wurde in einem Eppendorf-Becher der vom Hersteller mitgelieferte DNA-Kondensationspuffer (Puffer EC) und der *Enhancer* nacheinander zur DNA pipettiert. Dieses DNA-Gemisch wurde 2 bis 5 min bei RT belassen. Danach wurde in diesen Ansatz das Transfektionsreagenz pipettiert und zur Ausbildung von Lipid-DNA-Komplexen 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde dem Lipid-DNA-Gemisch FKS-haltiges Medium zugegeben und zu den Zellen pipettiert. Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses zwischen DNA und Effectene<sup>®</sup> wurde das vom Hersteller empfohlene Pipettierschema verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von mindestens 5 Stunden bei 37°C konnten die Zellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz eingesetzt werden.

#### 3.2.1.12 Bestimmung der Transfektionseffizienz

24 Stunden nach der Transfektion wurden diejenigen Kavitäten einer Zellkulturplatte (Greiner, Frickenhausen), die am Tag zuvor mit dem Plasmid pCIneoLacZ transfiziert worden waren sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Fixierlösung 5 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit X-Gal-Färbelösung bedeckt und für 2 Stunden bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Während dieser Inkubation produzierten diejenigen Zellen das Enzym  $\beta$ -Galactosidase, welche aufgrund erfolg-

reicher Transfektion mit pCIneoLacZ das entsprechende Gen eingebaut hatten. X-Gal wurde durch die Aktivität dieses Enzyms in einen indigoblauen Farbstoff umgesetzt, wodurch die positiven Zellen unter dem Lichtmikroskop blau erschienen.

Die anschließende Auszählung der farb-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zählgitters, das in das Okular eines Mikroskopes eingesetzt werden konnte. 10 x 16 Quadrate wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt (16 Quadrate entsprachen einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>), der Durchschnittswert ermittelt und dieser mit der Fläche der Kavität in mm<sup>2</sup> multipliziert (6er-Platte: 960 mm<sup>2</sup>, 12er-Platte: 380 mm<sup>2</sup>, 24er-Platte: 200 mm<sup>2</sup>, 96er-Platte: 32 mm<sup>2</sup>). In Relation gesetzt zu der eingesetzten Zellzahl und multipliziert mit 100 ergab sich die Transfektions-effizienz in Prozent.

### **3.2.2 Zellbiologische Methoden**

Alle Kultivierungs- und Versuchsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank), mit sterilen Arbeitsmaterialien und sterilen Lösungen. Die Kulturen wurden täglich unter dem Mikroskop auf eventuelle Kontaminationen überprüft.

#### **3.2.2.1 Zellkultivierung**

Den Versuchen lagen humane retinale Pigmentepithelzellen (hRPE-Zellen) zugrunde. Vorwiegend kam eine Permanent-Zelllinie, die vom Hersteller (Clontech, Heidelberg) mit dem Gen für Telomerase-Reverse-Transkriptase transfiziert wurde, zum Einsatz (hTERT-RPE1-Zellen).

Daneben wurden Vergleichsstudien mit humanen RPE-Zelllinien der Passagen 3 bis 5 durchgeführt. Bei den Primärkulturen handelte es sich um drei verschiedene Spender-hRPE-Zelllinien, die vom Zelllabor der Augenklinik der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt wurden. Die Ethikkommission der Universität Leipzig hatte der Verwendung von humanem Zellmaterial für diese Experimente zugestimmt. Bei einem Spender handelte es sich um einen 16-jährigen weiblichen Spender (im weiteren Text benannt als hRPE-Zelllinie 1), bei den anderen beiden um einen 20-

jährigen männlichen Spender (nachfolgend benannt als hRPE-Zelllinie 2) beziehungsweise 39-jährigen männlichen Spender (nachfolgend benannt als hRPE-Zelllinie 3).

Die Zellen wurden in 75 cm<sub>2</sub>-Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) mit komplettem Medium (bei den hTERT-RPE1-Zellen: Dulbecco's modified eagle's Medium nutrient mixture F-12 Ham; bei den hRPE-Zelllinien 1/2/3: Nut. Mix. F-10 Ham mit Glutamax) in Inkubatoren bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte kultiviert, das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Waren die Zellen zu einem Monolayer gewachsen, also konfluent, so wurden sie passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> gewaschen, mit 10 ml Trypsinlösung bedeckt und 7 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die vom Flaschenboden abgelösten Zellen resuspendiert und bei 4°C und 1450 rpm 7 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in komplettem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Während das Alter der Kultur bei den hRPE-Zelllinien 1, 2 und 3 in Passagen beschrieben wurde, erfolgte bei den hTERT-RPE1-Zellen die Angabe in Populationsdopplungen (PD). Zum Zeitpunkt des Kaufes hatte die immortalisierte Permanent-Zelllinie eine Initial-PD von 118,1. Weitere PD wurden entsprechend der Vorgabe des Herstellers berechnet.

#### 3.2.2.2 Immunzytochemische Untersuchungen

Zur immunhistochemischen Färbung wird ein Primärantikörper, der spezifisch an ein Protein bindet, zusammen mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper (Sekundärantikörper), der spezifisch an den Primärantikörper (Fc-Fragment) bindet und zur Detektion mit einem Farbstoff oder Enzym gekoppelt ist.

Als Primärantikörper wurde ein Antikörper gegen den Zytoskelettbestandteil Zytokeratin, der zur Gruppe der Intermediärfilamente gezählt wird, verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein mit CY3 gekoppelter Ziege-Anti-Maus-Antikörper. CY3 ist ein fluoreszierender Indocyaninfarbstoff, der nach Exzitation mit Licht der

Wellenlänge 552 nm eine Orange-Fluoreszenz der Wellenlänge 570 nm aufweist. hRPE-Zellen wurden in *4er-chamber slides* (Greiner, Frickenhausen) eingesät und 2 Tage in Kultur gehalten. Vor Beginn der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Fixierung der hRPE-Zellen mit Methanol (9 min) und Aceton (1 min) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen einmalig mit dem Immunfluoreszenz-Waschpuffer gewaschen. Anschließend inkubierten die Zellen mit dem Blockierungspuffer 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgeklopft und die hRPE-Zellen wurden 60 min bei RT mit dem Primärantikörper in feuchter Umgebung inkubiert. Die optimale Verdünnung der Antikörper mit Waschpuffer wurde in Dosis-Wirkungskurven für jeden Antikörper bestimmt (Anti-Zytokeratin: 1:50, negative Kontrolle: 1:100). Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit dem Immunfluoreszenz-Waschpuffer für jeweils 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:400 für 45 min abgedunkelt bei RT inkubiert, anschließend drei Mal gewaschen und dann mit Glyzerol-Gelatine eingedeckelt. Über Nacht konnten die Präparate trocknen und wurden danach unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop® der Firma Zeiss ausgewertet und fotografiert.

### 3.2.2.3 T-Lymphozytenpräparation und Makrophagengewinnung

10 ml Ficoll-Paque® (Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) wurden mit humanem Spender-Vollblut (25 ml) in einem Leukosep®-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überschichtet und 10 min bei 3800 rpm und RT zentrifugiert. Von oben nach unten ergab sich folgende Schichtung: Plasma-MNZ-Ficoll-Paque®- Filterscheibe- Ficoll-Paque®-Erythrozyten. Die mononukleären Zellen konnten mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Probenröhrchen (beides Greiner, Frickenhausen) transferiert und mit PBS gewaschen werden. Um im Zellpellet vorhandene Erythrozyten zu entfernen, wurde dieses mit 10 ml Hämolysepuffer resuspendiert und 10 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 min bei 1450 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Anschließend wurde es mit komplettem RPMI 1640 Medium resuspendiert und in einer 75 cm<sub>2</sub>-Kulturflasche 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Inzwischen wurde eine Säule aus Nylonwolle (Uni-Sorb® der Firma Wak-Chemie, Bad Homburg) mit komplettem Medium gespült und anschließend mit maximal  $8 \times 10^7$  Lymphozyten aus dem Kulturüberstand in maximal 2 ml Volumen beladen und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit blieben die B-Lymphozyten an der Nylonwolle haften, während die T-Zellen anschließend nach Spülen mit Medium aus der Säule gelöst werden konnten. Die adhärenierten Makrophagen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner, Frickenhausen) vom Boden der Kulturflasche abgelöst und in ein Probenröhrchen überführt. T-Lymphozyten und Makrophagen wurden 5 min bei 1450 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einem geeigneten Volumen komplettem Medium resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

#### 3.2.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl (Viability-Test)

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden hRPE-Zellen trypsinisiert und das erhaltene Zellpellet mit 1 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Nach einer Verdünnung von 50 µl der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 wurde der Anteil vitaler und toter Zellen (Blaufärbung) mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer quantitativ ermittelt und anhand folgender Formel in Relation zueinander gesetzt:

$$p = \frac{P \times 100}{G}$$

p... prozentualer Anteil vitaler Zellen

P... Anzahl vitaler beziehungsweise ungefärbter Zellen

G... Gesamtzellzahl (gefärbte + ungefärbte Zellen)

#### 3.2.2.5 Nachweis der MHC Klasse II-Expression

Dazu wurden die trypsinisierten hRPE-Zellen in FACS-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) pipettiert und zweimal mit jeweils 250 µl FACS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 4°C mit dem Phycoerythrin-markierten und gegen MHC Klasse II-Moleküle gerichteten monoklonalen Anti-

körper I2-RD1 im Verhältnis 1:100. Die Zellen wurden erneut zweimal mit je 250 µl FACS-Puffer gewaschen, das Zellpellet mit 300 µl Fixierpuffer resuspendiert und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden bei RT mit dem FACScan® und der Software CELLQuest® (beide Becton Dickinson, Heidelberg) bei 488 nm gemessen. Neben FSC und SSC wurde bei den insgesamt 10000 gezählten Zellen die FL-2 (Fluoreszenz-2, eine Rot-Fluoreszenz) für die Messung von MHC Klasse II-positiven Zellen bestimmt.

#### 3.2.2.6 Apoptose-Messung mittels FACS

Die quantitative Darstellung apoptotischer und sekundär nekrotischer hRPE-Zellen im FACS erfolgte mit Hilfe des Annexin V FITC (Fluoreszein-5-Isothiozyanat)-Kit. Annexin V, ein früher Apoptose-Marker, bindet als Kalzium- und Phospholipid-Bindungsprotein mit hoher Affinität an den Zellmembranbestandteil Phosphatidylserin (PS); dies ist ein negativ geladenes Phospholipid, das sich im Inneren der Zellmembran befindet. Im Verlauf der frühen Phase der Apoptose (auch programmierter Zelltod genannt) verliert die Zellmembran ihre Symmetrie und das Fluoreszein-konjugierte Annexin V kann nun an das ungeschützt liegende PS binden. Propidiumiodid bindet an DNA, so dass nur dann DNA gemessen werden kann, wenn die Integrität der Zellmembran nicht mehr gegeben ist. Bei einer FACS-Analyse sind Annexin V FITC-positive und Propidiumiodid-negative Zellen apoptotische Zellen, während Annexin V FITC- und Propidiumiodid-positive Zellen sekundär nekrotische Zellen sind.

Die Zellen wurden gemäß Kit-Protokoll für die Messung vorbereitet und anschließend in FACS-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) mit Hilfe des FACScan® und der Software CELLQuest® ( beide Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die insgesamt 5000 gezählten Zellen wurden zunächst anhand ihrer Lichtstreuung (FSC, SSC) charakterisiert und anschließend entsprechend ihrer Fluoreszenzfarbe und -intensität dargestellt, wobei mit FL-1 (Fluoreszenz 1) die Grün-Fluoreszenz von FITC, mit FL-3 die Orange-Fluoreszenz von Propidiumiodid gemessen wurde.

### 3.2.2.7 Messung des Proteins IL-10 mittels ELISA

Als Nachweis für das Vorhandensein von IL-10 diene der ELISA-Kit „Quantikine humane IL-10“. Dafür wurden Kulturüberstände gesammelt und bei -20°C bis zur Durchführung des Tests gelagert. Die Proben wurden für den Testansatz 1:10 verdünnt und nach Anweisung des Test-Herstellers behandelt. Anschließend konnte mit dem Spectra Max 250® der Firma Molecular Devices, Ismaning, zusammen mit der Software SOFT max Pro® jeweils die durchschnittliche Optische Dichte bei 450 nm gemessen und durch Abtragung dieser Werte auf die Standardkurve die jeweiligen IL-10-Konzentrationen in pg/ml ermittelt werden.

### 3.2.2.8 Bestimmung der T-Lymphozytenproliferation mittels MTT-Test

hRPE-Zellen wurden in 96er-Zellkulturplatten eingesät, transfiziert und 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie zusammen mit 25 µl/ml Mitomycin C 20 min lichtgeschützt bei 37°C belassen, um das Zellwachstum der hRPE-Zellen zu unterbinden und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden T-Lymphozyten alleine beziehungsweise zusammen mit Makrophagen zu den hRPE-Zellen pipettiert, so dass zum Schluss ein hRPE-T-Lymphozyten-Verhältnis von 1:10 beziehungsweise ein hRPE-Makrophagen-Verhältnis von 1:1 vorlag. Nach einer unterschiedlichen Inkubationsdauer der Zellkulturplatten (2 bis 7 Tage) bei 37°C wurde der MTT-Test nach MOSMANN (1983) angewendet, um die T-Lymphozytenproliferation quantitativ zu bestimmen. Dafür wurde in jede Kavität 10 µl MTT pipettiert und die Kulturplatten inkubierten anschließend 4 Stunden bei 37°C. Die in den Mitochondrien vorhandenen Dehydrogenasen spalteten während dieser Zeit zunächst den Tetrazoliumring des anfangs gelblichen MTT und wandelten es anschließend in blau-schwarze Formazan-Kristalle um, wobei die gebildete Menge an diesen Kristallen proportional zur Zellzahl war. Um die Reaktion abzustoppen und um die Kristalle aufzulösen wurden 100 µl SDS/DMF, ein Gemisch aus organischem Lösungsmittel und Detergens, pro Kavität zugegeben.

Nach einer abschließenden Inkubation von ca. 12 bis 18 Stunden bei 37°C konnte eine photometrische Auswertung bei 570 nm mit Hilfe des Spectra Max 250® (Molecular Divices, Ismaning) und der Software SOFT max Pro® erfolgen. Die

Auswertung der einzelnen gemessenen Werte für die optische Dichte erfolgte durch Berechnung des Proliferationsindex nach folgender Formel:

$$\text{Proliferationsindex [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Test}}}{\text{OD}_{\text{Ko}} - \text{OD}_{\text{Blk}}} \times 100$$

OD	Optische Dichte
Ko	Kontrolle
Blk	Blank

#### 3.2.2.9 Hemmung des IL-10 durch Anti-IL-10-Antikörper

Dazu wurden hRPE-Zellen zunächst in 96er-Zellkulturplatten eingesät und trans-fiziert. Nach einer 5-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 25 µl/ml Mitomycin C für 20 min und lichtgeschützt bei 37°C belassen und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden T-Lymphozyten gemeinsam mit Makrophagen als professionelle APC (Gewinnung siehe Kapitel 3.2.2.3) pipettiert, so dass zum Schluss ein hRPE-T-Lymphozyten-Verhältnis von 1:10 und ein hRPE-Makrophagen-Verhältnis von 1:1 vorlag. Bevor die Zellkulturplatten bei 37°C inkubierten, wurden Anti-IL-10-Antikörper zupipettiert: nach Angabe des Hersteller kann 0,5 µg/ml dieses Antikörpers eine IL-10-Menge von 12,1 ng/ml zu 100 % neutralisieren. Aus diesem Grund musste zuerst aus Kulturüberständen die genaue IL-10-Menge mittels ELISA bestimmt werden. Nach verschiedenen Zeit-punkten (2 bis 4 Tage) wurde der MTT-Test nach MOSMANN (1983) angewendet, um die T-Lymphozytenproliferation quantitativ zu messen. Die Auswertung der jeweils gemessenen Werte für die optische Dichte erfolgte ebenfalls durch die Berechnung des Proliferationsindex.



### **3.2.3 Statistische Auswertung**

Die dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte (MW) von Mehrfachbestimmungen mit ihren Standardfehlern (SEM) dar. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte mit der Software SigmaStat® 2.1 mit Hilfe des t-Testes nach STUDENT beziehungsweise mittels ANOVA-Test. Signifikante Unterschiede lagen vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ( $p \leq 0,05$ ) lag; sie sind in den Tabellen mit \* gekennzeichnet.

## 4. Ergebnisse

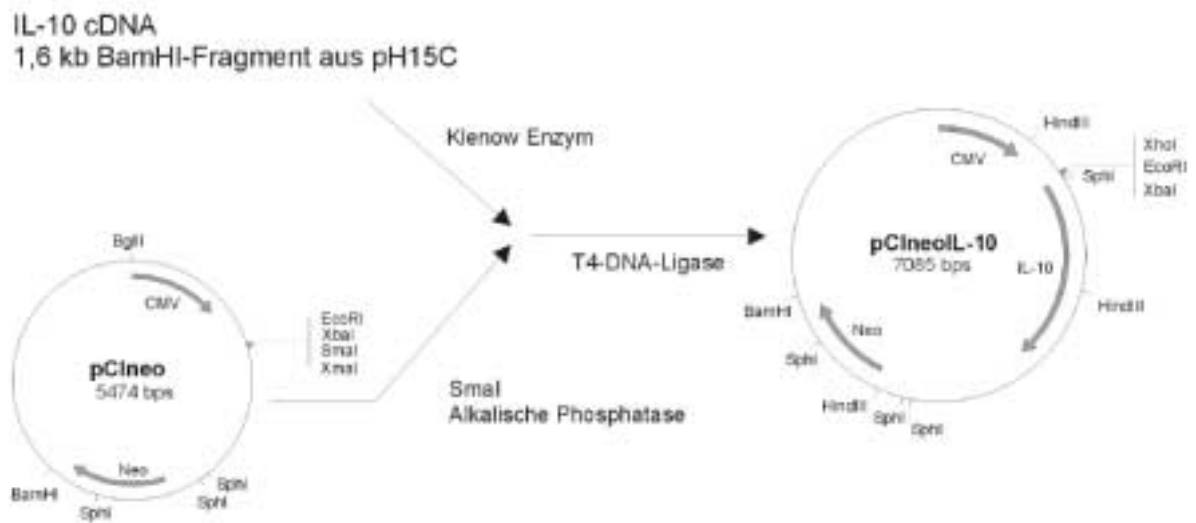
### 4.1 Konstruktion eines Expressionsvektors für humanes IL-10

Für die Konstruktion eines Expressionsvektors für humanes IL-10 standen der Säugerzellen-Expressionsvektor pCIneo sowie das Plasmid pH15C zur Verfügung. Das Plasmid pCIneo kodiert für die beiden Resistenzgene Ampicillin und Neomycin. Als Promotor, der die Expression in Säugerzellen ermöglicht, diente derjenige des CMV. Außerdem sind für verschiedene Restriktionsendonukleasen diverse einmalige Schnittstellen, aber auch multiple zur Identifizierung von Plasmiden vorhanden.

Im ersten Schritt wurde das Plasmid pCIneo mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* linearisiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Rezirkularisierung nach Zugabe der Ligase zu verhindern. Das einfach schneidende Enzym *SmaI* erzeugt „glatte Enden“. Parallel dazu wurde das Plasmid pH15C mit *BamHI* geschnitten. Damit war es möglich, das 1,6 kb große IL-10-Gen-Insert vollständig zu entfernen. Das Restriktionsenzym *BamHI* erzeugt 5' überhängende Enden. Diese wurden anschließend mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt, um eine später folgende Ligation des Inserts IL-10 mit dem linearisierten Plasmid pCIneo zu ermöglichen.

Nach der Modifikation der Restriktionsenden erfolgte die elektrophoretische Auftrennung und damit gleichzeitig eine Aufreinigung der DNA. Der mit *SmaI* linearisierte pCIneo-Vektor hatte eine Größe von 5,4 kb. Die beiden Produkte von pH15C hatten eine Größe von ca. 3,6 kb und 1,9 kb. Das kleinere Fragment entsprach der cDNA des humanen IL-10-Gens. Bei beiden Plasmiden wurden die jeweiligen Fragmentgrößen unter Zuhilfenahme einer mit *HindIII* geschnittenen  $\lambda$ -DNA und eines 1000 bp-DNA-Markers geschätzt. Nach der Isolierung der Vektor-DNA und des IL-10-Fragmentes aus dem Agarosegel wurde die DNA quantifiziert. Der Vektor hatte eine Konzentration von 30,7 ng/ $\mu$ l (Faktor 1,9), die gemessene Menge an IL-10-Insert betrug 22,6 ng/ $\mu$ l (Faktor 1,8). Insert und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 für die Ligrationsreaktion eingesetzt.

Die Schritte der Konstruktion von pCIneo IL-10 sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Konstruktion von pCIneoIL-10.

Darstellung der Plasmide, der eingesetzten Enzyme und Restriktionsendonukleasen.

Nach Beendigung der Ligationsreaktion wurden daraus Aliquote zur Transformation superkompetenter *E.coli* JM109 eingesetzt. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Ampicillin. Aufgrund des im Vektor eingebauten Ampicillin-Resistenzgens konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den über Nacht gewachsenen Kolonien um ampicillinresistente Transformanten handelte. 13 ampicillinresistente Kolonien wurden ausgezählt und anschließend in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C kultiviert. Mit Hilfe der Plasmid-Minipräparation wurde die Plasmid-DNA präpariert. Anschließend wurde die Orientierung des eingebauten IL-10-Gens in das Plasmid pCIneo überprüft, indem diese Plasmide mit der dreifach schneidenden Restriktionsendonuklease *HindIII* verdaut wurden. *HindIII* schneidet charakteristisch (eine Schnittstelle auf IL-10-Gen, siehe Abb. 1) in der Nähe des 5'Endes, so dass eine Identifizierung der Orientierung des IL-10-Gens möglich war. Als Produkte der Ligation können theoretisch verschiedene Plasmide entstehen, bei denen es sich beispielsweise um ligierten Vektor (pCIneo), um eingebautes IL-10-Insert in richtiger (pCIneoIL-10-sense; 5'→3') oder um eingebautes IL-10-Insert in falscher Orientierung

(pCIneoIL-10-antisense; 3'→5') handelt; die Orientierung des IL-10-Insert wird bestimmt durch die Orientierung des Promotors. Daher wurden die bestimmten Fragmentgrößen sowohl für pCIneoIL-10-sense als auch für das Plasmid pCIneoIL-10-antisense errechnet und mit den experimentell erhaltenen Größen verglichen. In Tab. 1 sind die errechneten und experimentellen Fragmentgrößen der einzelnen Plasmide zusammengefasst.

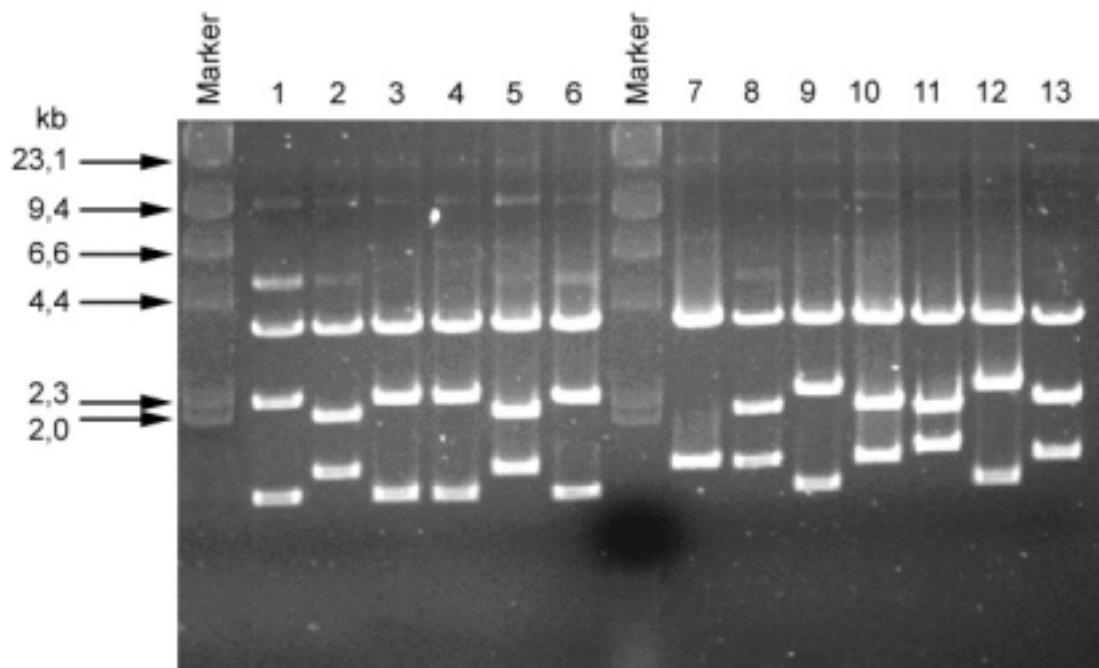
**Tabelle 1:** Vergleich der theoretisch zu erwartenden mit den experimentell ermittelten Fragmentgrößen von pCIneoIL-10-sense, pCIneoIL-10-antisense und pCIneoLacZ nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen (Restriktasen) *HindIII* und *EcoRI*.

Plasmid	Restriktase	Fragmentgrößen [kb]		Total [kb]
		theoretisch	experimentell	
pCIneoIL-10-sense	<i>HindIII</i>	1,29; 1,98; 3,82	1,40; 2,01; 3,67	7,08
	<i>EcoRI</i>	7,09	7,46	7,46
pCIneoIL-10-antisense	<i>HindIII</i>	1,06; 2,21; 3,82	1,36; 2,30; 3,86	7,52
	<i>EcoRI</i>	7,09	8,10	8,10
pCIneoLacZ	<i>HindIII</i>	3,81; 4,85	3,86; 4,66	8,52
	<i>EcoRI</i>	8,66	9,59	9,59

Aus den in Tab. 1 errechneten (theoretischen) Fragmentgrößen für beide Orientierungen des IL-10-Gens (sense und antisense) konnten beide Klone in der Elektrophorese identifiziert werden. Die Plasmide erhielten jeweils die Bezeichnung pCIneoIL-10-sense (in nachfolgenden Experimenten benannt als „pCIneoIL-10“) oder pCIneoIL-10-antisense und wurden bei den weiteren Experimenten eingesetzt. Sechsmal lagen sense und sechsmal antisense vor.

Wie in Tab. 1 dargestellt hatten die Fragmente von pCIneoIL-10-sense die gewünschte Größe, die mit den theoretisch errechneten Größen gut übereinstimmten. Die Produkte aus dem Verdau von pCIneoIL-10-antisense mit *HindIII* konnten ebenfalls nach elektrophoretischer Auftrennung eindeutig zugeordnet werden

(Abb. 2 und Tab. 1). Die Fragmente von pCIneoIL-10-sense hatten eine geschätzte Größe von ca. 1,29 kb, 1,98 kb, 3,82 kb (*HindIII*) und ca. 7,09 kb (*EcoRI*) (siehe auch Abb. 3), bei pCIneoIL-10-antisense lagen die Vergleichswerte bei ca. 1,06 kb, 2,21 kb, 3,82 kb (*HindIII*) und ca. 7,09 kb (*EcoRI*). Bei allen Plasmiden diente als Längenstandard *HindIII*-geschnittene  $\lambda$ -DNA zur ungefähren Einschätzung der einzelnen Fragmentgrößen. In Abb. 2 ist die Elektrophorese im Anschluss an den *HindIII*-Verdau dargestellt. Deutlich sind zwei verschiedene Bandenmuster zu identifizieren.

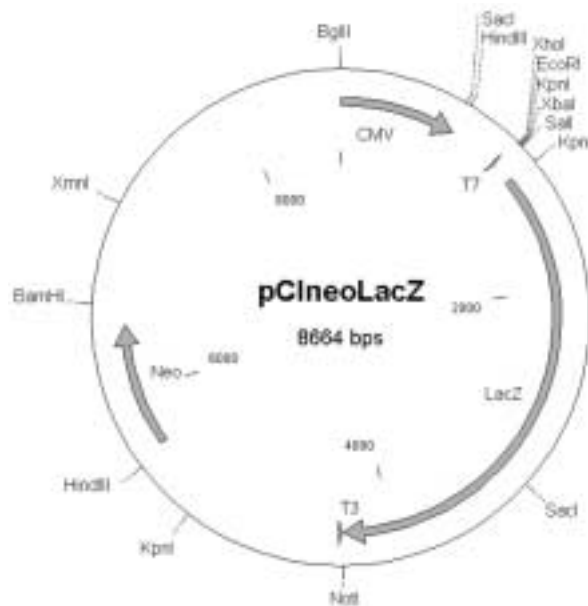


**Abbildung 2:** Identifizierung der pCIneoIL-10-Plasmide durch Elektrophorese.

Aufgrund der unterschiedlichen Bandenmuster nach *HindIII*-Verdau sind pCIneoIL-10-sense (3,82 kb, 1,98 kb und 1,29 kb) und pCIneoIL-10-antisense (3,82 kb, 2,21 kb und 1,06 kb) unterscheidbar (siehe auch Tab. 1). Spuren: pCIneoIL-10-sense (2, 5, 8, 10, 11, 13), pCIneoIL-10-antisense (1, 3, 4, 6, 9, 12), keine Zuordnung möglich (7), mit *HindIII* geschnittene  $\lambda$ -DNA (Marker).

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden die identifizierten Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin kultiviert. Anschließend erfolgte eine Maxipräparation der Plasmid-DNA pCIneoIL-10-sense und pCIneoIL-10-antisense. Zusätzlich wurde das Plasmid pCIneoLacZ (siehe Abb. 3), das die bakterielle  $\beta$ -

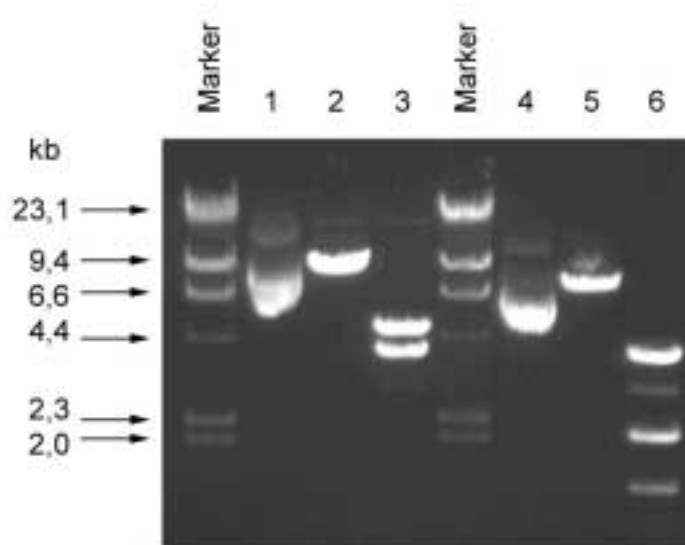
Galaktosidase-Gen als Reportergen enthält, für die Transfektion präpariert. In Abb. 3 ist das Plasmid pCIneoLacZ schematisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Darstellung des Expressionsvektors pCIneoLacZ mit den Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

Die Plasmide pCIneoIL-10 und pCIneoLacZ wurden nach der Präparation mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* geschnitten. Nach einer Kontroll-Elektrophorese folgte die Größenbestimmung der einzelnen Fragmente.

Die Fragmente von pCIneoLacZ hatten eine geschätzte Größe von ca. 4,85 kb, 3,81 kb (*HindIII*) und ca. 8,66 kb (*EcoRI*). Da die Restriktionsendonuklease *EcoRI* nur eine Schnittstelle im Plasmid besitzt, ist zur Identifizierung der Plasmide das zwei- (pCIneoLacZ) beziehungsweise dreifach schneidende (pCIneoIL-10-sense, pCIneoIL-10-antisense; siehe auch Abb. 2) Enzym *HindIII* von größerer Bedeutung. In Abb. 4 ist eine typische Elektrophorese der Plasmide pCIneoIL-10-sense und pCIneoLacZ zur Auswertung solcher Restriktionsenzymanalysen dargestellt.



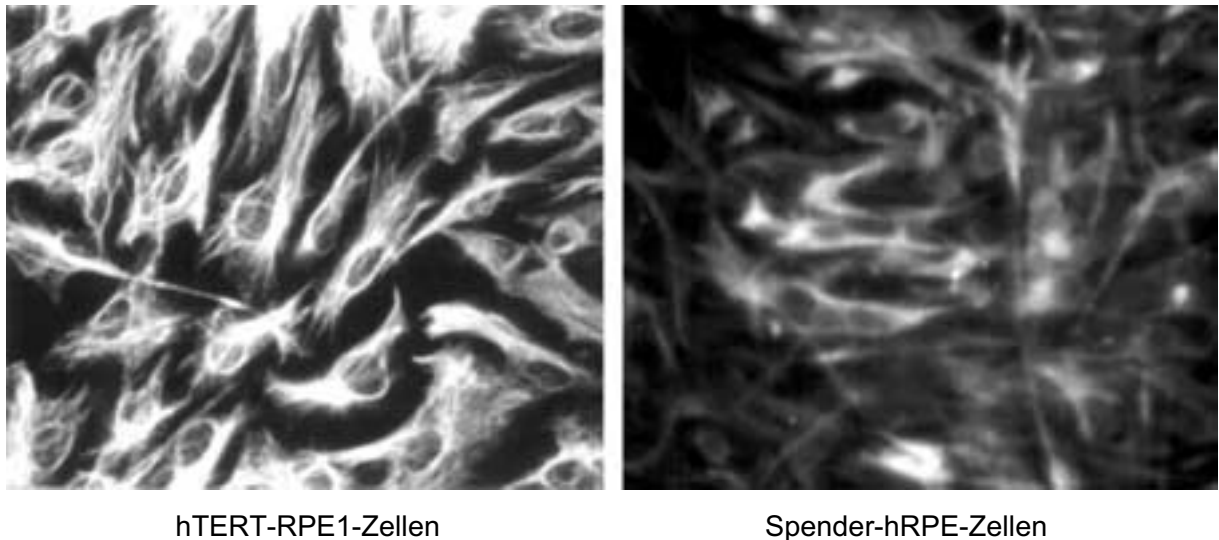
**Abbildung 4:** Restriktionsenzymanalyse von pCneoIL-10 und pCneoLacZ.

Aufgrund der spezifischen Schnittstellen von *HindIII* handelt es sich bei den untersuchten Plasmiden um pCneoLacZ und pCneoIL-10. Spuren: pCneoLacZ, ungeschnitten (1); pCneoLacZ, *EcoRI* (2); pCneoLacZ, *HindIII* (3); pCneoIL-10, ungeschnitten (4); pCneoIL-10, *EcoRI* (5); pCneoIL-10, *HindIII* (6); mit *HindIII* geschnittene  $\lambda$ -DNA (Marker).

## 4.2 Bestimmung des hTERT-RPE1-Zellcharakters

Zur immunhistochemischen Färbung (siehe auch Kapitel 3.2.2.2) wurden hRPE-Zellen in 4er-chamber slides mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen eingesät, 18 Stunden bei 37°C inkubiert und gefärbt.

Abb. 5 zeigt das Resultat der immunhistochemischen Färbung der hRPE-Zellen. In der vorliegenden schwarz-weiss-Abbildung sind die orange-fluoreszierenden Zellen hell dargestellt. Bei den kommerziell erworbenen hTERT-RPE1-Zellen handelt es sich damit um zytokeratinpositive retinale Pigmentepithelzellen. hRPE-Zellen der Zelllinie 1 dienten als Positiv-Kontrolle.



**Abbildung 5:** Fluoreszenzaufnahme einer hTERT-RPE1- (linkes Bild) beziehungsweise einer Spender-hRPE-Zellkultur (rechtes Bild). Hell dargestellt ist der Zytoskelettbestandteil Zytokeratin. In den Negativ-Kontrollen (nicht abgebildet) waren keine fluoreszierenden hRPE-Zellen erkennbar. 400-fache Vergrößerung.

### 4.3 Transfektion von hTERT-RPE1-Zellen und Spender-hRPE-Zellen

#### 4.3.1 Testung verschiedener Transfektionsreagenzien

Im ersten Teil der Untersuchungen stellten sich die Fragen, welches kommerziell erhältliche Transfektionsreagenz für die Transfektion humaner RPE-Zellen geeignet ist, gute Transfektionseffizienzen ergibt und keine toxische Wirkung auf die Zellen zeigt. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden verschiedene Reagenzien getestet.

Für diese Untersuchungen standen drei verschiedene Transfektionsreagenzien zur Verfügung. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pCIneoLacZ in hRPE-Zellen mit den Transfektionsreagenzien SuperFect™, Effectene™ und FuGENE™ 6 transfiziert (siehe auch Kapitel 3.2.1.11). Dafür wurden die Zellen mit einer je nach Größe der Zellkulturplatte unterschiedlichen Zelldichte (6er-Platte:  $1 \times 10^5$  Zellen/ Kavität; 12er-Platte:  $4 \times 10^4$  Zellen/Kavität; 24er-Platte:  $1 \times 10^5$  Zellen/Kavität) eingesät und transfiziert. Die Bestimmung der



Transfektionseffizienzen erfolgte mittels X-Gal-Färbung. In den Tabellen 2, 3 und 4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgeführt.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse unter Verwendung von SuperFect™ dargestellt. Dieses Reagenz besteht aus Dendrimer-Molekülen (=Polykationen), deren positiv geladene terminale Aminogruppen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA interagieren und diese umschließen. Der entstehende Dendrimer-DNA-Komplex wird mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen (HAENSLER u. SZOKA 1993). Für die Untersuchungen in 24er-Platten wurde die hRPE-Zelllinie 1 verwendet. Die höchste Effizienz von 4,6 % wurde bei einem SuperFect™-DNA-Verhältnis von 5:1 ermittelt. Bei der Anwendung höherer Konzentrationen an Transfektionsreagenz wurden hier zytotoxische Effekte festgestellt.

**Tabelle 2:** Transfektionseffizienz [%] bei verschiedenen Verhältnissen von DNA und SuperFect™. Zytotoxische Effekte bei höheren SuperFect™-Konzentrationen.

DNA [µg]	Transfektionseffizienz [%]		
	DNA:SuperFect™		
	1:2	1:5	1:10
0,5	0,03	0,2	0,2
1,0	0,7	3,0	2,4
2,5	4,6	5,6	*
5,0	*	*	*

\* zytotoxischer Effekt

Zur Ermittlung der Transfizierbarkeit der Zellen mit Effectene™ wurde die hRPE-Zelllinie 2 eingesetzt (12er-Platten). Hier konnte die maximale Transfektionsrate von 3,4 % bei einem Effectene™-DNA-Verhältnis von 10:1 ermittelt werden. Effectene™ gehört zu der Gruppe der kationischen Lipide. Die positiv geladenen Lipide lagern sich an die negativ geladene DNA an. Die Einschleusung des DNA-Lipid-Komplexes in die Zelle erfolgt mittels Endozytose (GROTH et al. 1998). Die

Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3 dargestellt. Auch hier wurden toxische Effekte auf die Zellen beim Einsatz höherer Konzentrationen an Effectene™ festgestellt.

**Tabelle 3:** Transfektionseffizienz [%] bei verschiedenen Verhältnissen von DNA und Effectene™. Bei höheren Konzentrationen an Effectene™ traten zytotoxische Effekte auf.

DNA [µg]	Transfektionseffizienz [%]		
	DNA:Effectene™		
	1:10	1:25	1:50
0,15	0,27	0,21	0,23
0,3	1,5	1,3	2,0
0,6	3,4	3,3	*

\* zytotoxischer Effekt

Die Ergebnisse des Optimierungstests mit dem Transfektionsreagenz FuGENE™6 sind in Tab. 4 dargestellt. FuGENE™6 wird, wie Effectene™, zu den kationischen Lipiden gezählt und besitzt dieselbe Wirkungsweise. Die Testung erfolgte mithilfe der hRPE-Zelllinie 2 in 6er-Platten. Die maximale Transfektionsrate von 10,9 % konnte bei einem FuGENE™6-DNA-Verhältnis von 3:2 ermittelt werden.

**Tabelle 4:** Transfektionseffizienz [%] bei verschiedenen Verhältnissen von DNA und FuGENE™6.

DNA [µg]	Transfektionseffizienz [%]		
	DNA:FuGENE™6		
	1:3	1:6	2:3
0,5		2,3	
1,0	5,6	7,0	
2,0	8,2		5,6
3,0	9,1		
4,0			10,9 <sup>a</sup>
6,0			8,6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> in den nachfolgenden Experimenten ist dieses Verhältnis benannt als 3:2<sup>a</sup>

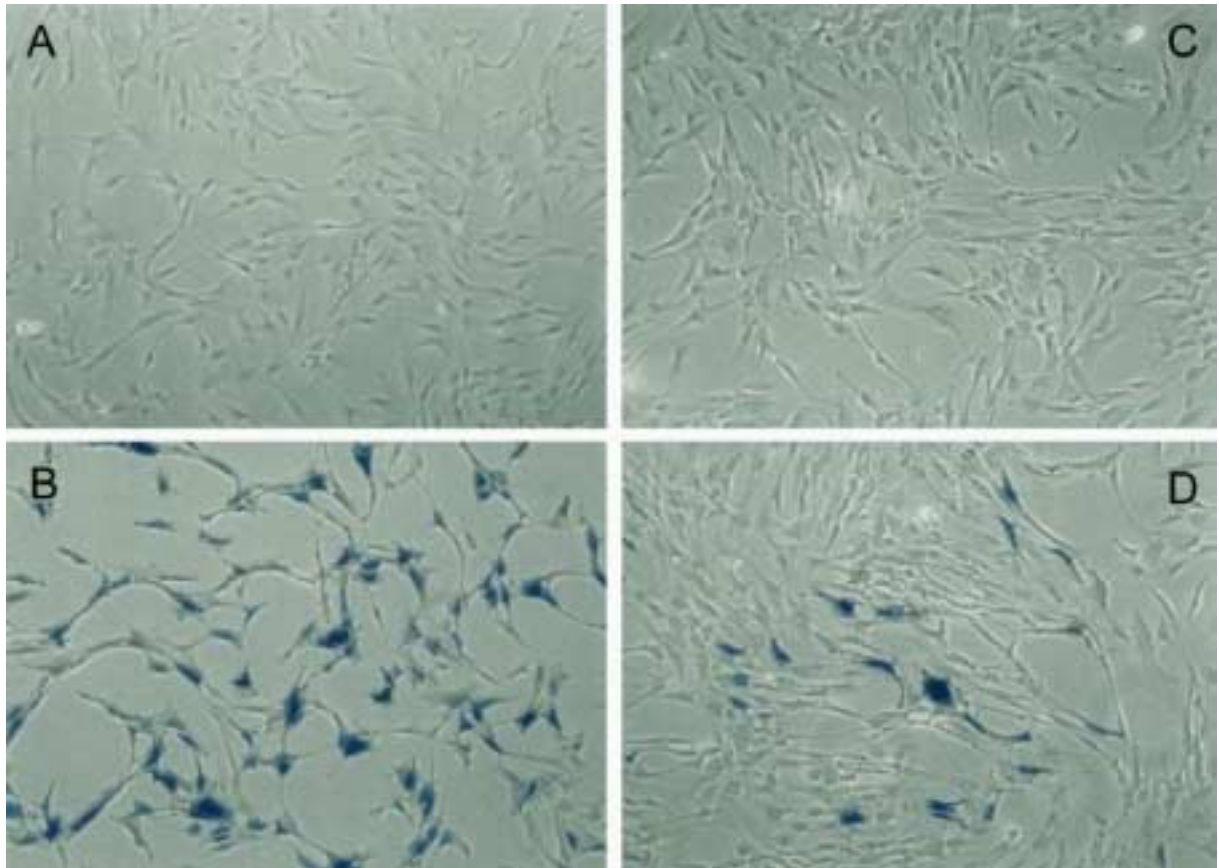
<sup>b</sup> in den nachfolgenden Experimenten ist dieses Verhältnis benannt als 3:2<sup>b</sup>

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit FuGENE™6 die höchsten Transfektionseffizienzen bei hRPE-Zellen im Vergleich mit SuperFect™ beziehungsweise Effectene™ erreicht wurden. Desweiteren waren sowohl mit SuperFect™ als auch mit Effectene™ toxische Effekte auf die Zellen festzustellen, während bei der Transfektion mit FuGENE™6 keine zytotoxischen Effekte zu beobachten waren. Aus diesen Gründen wurde bei den anschließend durchgeführten Experimenten zur Transfektion von hRPE-Zellen ausschließlich FuGENE™6 verwendet.

#### 4.3.2 Vergleich der Transfektionseffizienzen von hTERT-RPE1-Zellen und Spender-hRPE-Zellen

Ausgehend von dem, in Kapitel 4.3.1 ausgetesteten optimalen FuGENE™6:DNA-Verhältnis von 3:2<sup>a</sup> wurde die Transfektionseffizienz der hTERT-RPE1-Zellen mit derjenigen der Spender-hRPE-Zellen (hRPE-Zelllinien 1 und 2) verglichen. Bei dieser Untersuchung konnte mit FuGENE™6 eine durchschnittliche Transfektionseffizienz bei den hTERT-RPE1-Zellen von  $23,3 \pm 9,0$  % (n=15; Abb. 5B) und bei den Spender-hRPE-Zellen von  $10,3 \pm 4,5$  % (n=7; Abb. 5D) ermittelt werden.

Damit wies die immortalisierte Permanent-Zelllinie gegenüber den Spender-hRPE-Zellen eine doppelt so hohe Transfektionseffizienz auf. Repräsentative Ergebnisse von mit FuGENE™ 6 transfizierten hRPE-Zellen sind in Abb. 6 dargestellt.

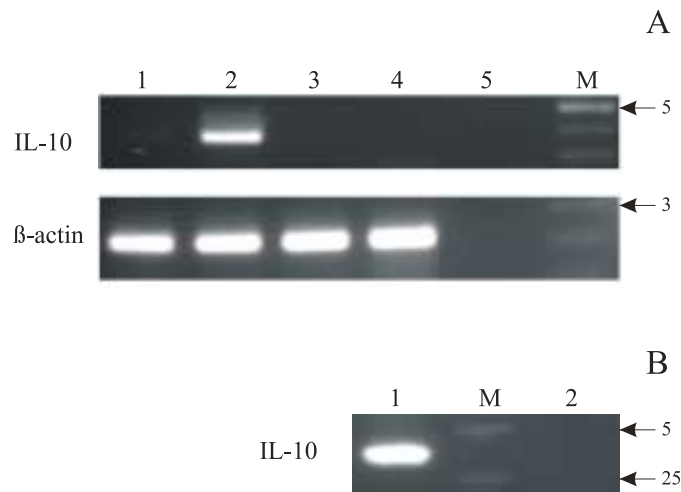


**Abbildung 6:** Mit dem Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 erreichte Transfektionseffizienz. Blau dargestellt sind die mit pCIneoLacZ transfizierten hRPE-Zellen nach X-Gal-Färbung: hTERT-RPE1-Zellen (B) und Spender-hRPE-Zellen (Zelllinie 1) (D). Als Kontrolle dienten untransfizierte hTERT-RPE1-Zellen (A) beziehungsweise Spender-hRPE-Zellen (C). 100-fache Vergrößerung.

#### 4.3.3 RT-PCR zum Nachweis der IL-10-mRNA

Zum Nachweis spezifischer mRNA in der PCR musste zunächst eine Total-RNA-Präparation von transfizierten und untransfizierten hRPE-Zellen durchgeführt werden. Dafür wurden die Zellen in 6er-Zellkulturplatten eingesät und mit der Plasmid-DNA pCIneoIL-10 transfiziert. Als Kontrolle dienten mit pCIneo und pCIneoLacZ transfizierte hRPE-Zellen sowie untransfizierte Zellen. Nach der Isolierung der RNA wurde diese auf ihre Reinheit überprüft. Bei der Messung der RNA im Gene Quant<sup>®</sup> hatte der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm einen Wert von >1,8; damit konnte von einer ausreichend reinen Probe ausgegangen werden. Im ersten Schritt wurde die Total-RNA für die Umschreibung in cDNA eingesetzt. Anschließend wurde ein Fragment der IL-10-cDNA in der PCR mit Hilfe sequenzspezifischer Primer amplifiziert. Zur Überprüfung der Qualität und der Quantität der eingesetzten Proben wurde zusätzlich eine PCR mit spezifischen Primern für  $\beta$ -Actin, ein Bestandteil des Zytoskeletts in allen Säugetierzellen, durchgeführt. Die Intensität dieser Banden war in der Elektrophorese in allen Proben gleich. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die eingesetzte cDNA und damit auch die eingesetzte Total-RNA in den Ansätzen in vergleichbarer Konzentration vorhanden war.

Das amplifizierte IL-10-Fragment sollte eine Größe von 383 bp aufweisen und lediglich bei den transfizierten hRPE-Zellen erscheinen (Abb. 7A). Zusätzlich wurde als Positiv-Kontrolle das Plasmid pCIneoIL-10 in der PCR eingesetzt (Abb. 7B). In Abb. 7 ist ein repräsentatives Gel mit den erwarteten Ergebnissen dargestellt.



**Abbildung 7:** Nachweis der IL-10-mRNA kultivierter hTERT-RPE1-Zellen durch RT-PCR.

Untersucht wurde die Total-RNA von transfizierten und untransfizierten Zellen. Das 383 bp-große IL-10-Fragment ist bei mit pCneoIL-10 transfizierten hRPE-Zellen nachweisbar (A2). Als positive Kontrolle diente das Plasmid pCneoIL-10 (B1) .

Spuren von A: untransfizierte Zellen (1), mit pCneoIL-10 transfizierte Zellen (2), mit pCneoLacZ transfizierte Zellen (3), mit pCneo transfizierte Zellen (4), ohne cDNA (negative Kontrolle; 5), 100 bp-Marker (M). Legende zu B: Plasmid pCneoIL-10 (positive Kontrolle; 1), Plasmid pCneo (negative Kontrolle; 2), 250 bp-Marker (M).

#### 4.3.4 ELISA zum Nachweis des Proteins IL-10

Zum Nachweis des Proteins IL-10 mittels ELISA (siehe auch Kapitel 3.2.2.7) wurden hRPE-Zellen in 96er-Zellkulturplatten mit einer Zelldichte von 7500 Zellen/Kavität eingesät und mit dem Plasmid pCneoIL-10 sowie für die Bestimmung der Transfektionseffizienz mit pCneoLacZ transfiziert. Die Kulturüberstände, die das exprimierte Protein IL-10 enthielten, wurden nach 1 bis 7 Tagen abpipettiert und die Menge des produzierten IL-10 quantitativ mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten mit dem Plasmid pCneoIL-10-antisense transfizierte hRPE-Zellen zwischen Tag 1 und 3. In Abb. 8 ist der zeitabhängige Verlauf der IL-10-Konzentrationen beider Zelllinien (hTERT-RPE1-Zellen und Zellen der hRPE-Zelllinie 1) graphisch dargestellt.

Bei den hTERT-RPE1-Zellen konnten IL-10-Konzentrationen zwischen  $5,7 \pm 1,9$  (Tag 1) und  $10,3 \pm 0,8$  (Tag 3) ng/ml gemessen werden, die IL-10-Spiegel der Tage 2, 4 und 5 bewegten sich zwischen  $8,7 \pm 1,5$  und  $9,1 \pm 0,9$  ng/ml, wobei eine

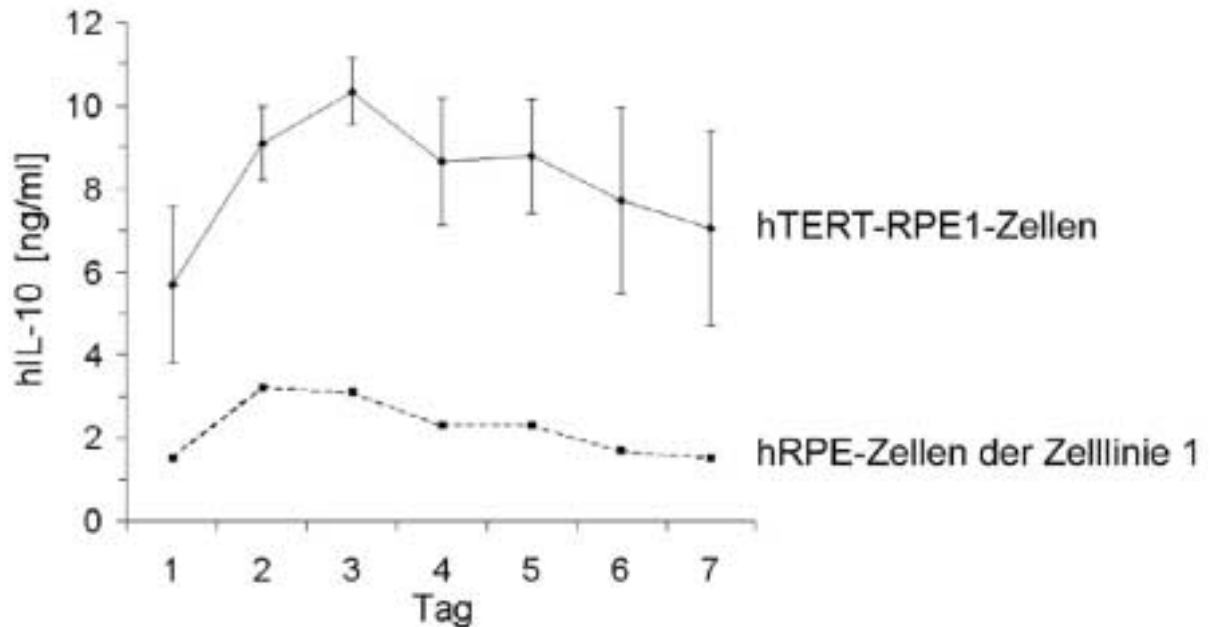
absteigende Tendenz der Werte am Tag 6 und 7 auf Konzentrationen von  $7,7 \pm 2,2$  beziehungsweise  $7,0 \pm 2,3$  ng/ml ersichtlich war.

Die niedrigste IL-10-Konzentration bei der hRPE-Zelllinie 1 lag auch hier am Tag 1 mit 1,5 ng/ml, der höchste Spiegel ebenfalls am Tag 3 (3,1 ng/ml). Ab dem Tag 3 sanken die Werte kontinuierlich, wobei aber wie auch bei hTERT-RPE1-Zellen ab dem Tag 6 der verhältnismäßig größte Abfall der IL-10-Konzentrationen zu erkennen war (Tag 5: 2,3 ng/ml; Tag 6: 1,7 ng/ml; Tag 7: 1,5 ng/ml).

Die Kontrolle lieferte bei beiden Zelllinien eine IL-10-Konzentration von 0 ng/ml. Außerdem bestand ein Zusammenhang zwischen produziertem Protein IL-10 und der Transfektionseffizienz. Die mittlere Transfektionseffizienz der hTERT-RPE1-Zellen betrug bei diesen Versuchen  $14,6 \pm 4,4$  % und lag damit 3,5-fach über der der hRPE-Zelllinie 1 mit 4,1 %. Den gleichen Unterschied besaß deren IL-10-Produktion.

Zusammenfassend lässt sich bei beiden Zelllinien das Protein IL-10 in den Kulturüberständen in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisen. Das Konzentrationsmaximum bei der hTERT-RPE1-Zellen sowie bei der hRPE-Zelllinie 1 lag am Tag 3. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und synthetisierter IL-10-Konzentration festgestellt werden: bei einer höheren Transfektionseffizienz wurde eine höhere Menge an IL-10-Protein von den Zellen synthetisiert, was theoretisch zu erwarten war.

In Abb. 8 ist der zeitabhängige Verlauf der IL-10-Konzentrationen graphisch dargestellt.



**Abbildung 8:** Graphische Darstellung der von transfizierten hTERT-RPE1-Zellen synthetisierten Menge an IL-10 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Konzentrationsbestimmung des Zytokins [ng/ml] mittels ELISA (n=3).

#### 4.4 Wirkung von IFN- $\gamma$ auf die MHC Klasse II-Expression

Zur Aktivierung sowohl der hTERT-RPE1-Zellen als auch der hRPE-Zelllinie 3 wurden diese mit IFN- $\gamma$  inkubiert und danach auf eine vorhandene MHC Klasse II-Expression untersucht (siehe auch Kapitel 3.2.2.5). Dazu wurde eine 24er-Zellkulturplatte mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Kavität eingesät und über 24, 48, 72 und 96 Stunden mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (hTERT-RPE1-Zellen: 50 U/ml, 100 U/ml, 250 U/ml; hRPE-Zelllinie 3: 100 U/ml, 250 U/ml, 500 U/ml) stimuliert. Durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  nahm die Zahl der MHC Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche beider hRPE-Zelllinien signifikant zu. Eine Übersicht der nachfolgenden Ergebnisse ist in Tab. 5 (hTERT-RPE1-Zellen) bzw. in Tab. 6 (hRPE-Zellen der Zelllinie 3) gegeben.



Bei den hTERT-RPE1-Zellen lag nach 24 Stunden die höchste MHC Klasse II-Expression mit Werten von  $60,3 \pm 9,7 \%$  (50 U/ml),  $80,6 \pm 3,7 \%$  (100 U/ml) und  $86,1 \pm 2,5 \%$  (250 U/ml) vor. Etwas niedrigere Prozentsätze wurden nach 48 Stunden beobachtet. Die Anzahl der positiven Zellen lag nach diesem Zeitraum bei  $50,6 \pm 11,8 \%$  (50 U/ml),  $72,3 \pm 3,4 \%$  (100 U/ml) und  $83,4 \pm 2,3 \%$  (250 U/ml). Nach 72 Stunden wurde eine MHC Klasse II-Expression von  $36,7 \pm 9,8 \%$  (50 U/ml), von  $54,6 \pm 2,1 \%$  (100 U/ml) und von  $63,6 \pm 1,3 \%$  (250 U/ml) gemessen. Nach 96 Stunden wurden die wenigsten MHC Klasse II-positiven Zellen gezählt; die Werte lagen bei  $6,5 \pm 2,3 \%$  (50 U/ml),  $9,2 \pm 1,9 \%$  (100 U/ml) und  $11,2 \pm 3,4 \%$  (250 U/ml). Nach einer Behandlung der hTERT-RPE1-Zellen beispielsweise mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  wurde demzufolge eine Abnahme der positiven Zellen von  $80,6 \pm 3,7 \%$  am Tag 1 (24 Stunden) auf  $9,2 \pm 1,9 \%$  am Tag 4 (96 Stunden) beobachtet. Eine ähnliche Abnahme der MHC Klasse II-Expression von Tag 1 auf Tag 4 konnte ebenfalls bei allen übrigen Konzentrationen beobachtet werden. Unbehandelte Zellen (ohne IFN- $\gamma$ ) als Kontrolle, die über 24, 48, 72 beziehungsweise 96 Stunden mit komplettem Medium kultiviert wurden, zeigten zwischen Tag 1 und 4 Werte zwischen  $0,6 \pm 0,4 \%$  und  $0,9 \pm 0,4 \%$  und wiesen damit keine signifikanten Unterschiede auf.

Bei der hRPE-Zelllinie 3 wurden nach 24 Stunden die wenigsten MHC Klasse II-positiven Zellen mit Werten von  $6,5 \pm 3,3 \%$  (100 U/ml),  $14,8 \pm 13,4 \%$  (250 U/ml) und  $19,9 \pm 14,8 \%$  (500 U/ml) gezählt. Je nach Länge der Inkubationsdauer nahm auch die MHC Klasse II-Expression zu. Am Tag 2 (48 Stunden) konnte ein Anteil positiver Zellen von  $26,8 \pm 12,1 \%$  (100 U/ml),  $59,2 \pm 18,9 \%$  (250 U/ml) und  $71,8 \pm 16,7 \%$  (500 U/ml) und am Tag 3 (72 Stunden) ein Anteil positiver Zellen von  $48,9 \pm 8,9 \%$  (100 U/ml),  $73,8 \pm 16,7 \%$  (250 U/ml) und  $89,3 \pm 9,0 \%$  (500 U/ml) gemessen werden. Am Tag 4 (96 Stunden) wurde die höchste MHC Klasse II-Expression mit Werten von  $61,9 \pm 21,0 \%$  (100 U/ml),  $80,9 \pm 7,0 \%$  (250 U/ml) und  $91,0 \pm 6,0 \%$  (500 U/ml) beobachtet. Am Tag 4 führte eine Behandlung der Zellen mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  zu einem Anstieg der MHC Klasse II-positiven Zellen von  $6,5 \pm 3,3 \%$  (24 Stunden) auf  $61,9 \pm 21,0 \%$  (96 Stunden), bei einer IFN- $\gamma$ -Konzentration von 250 U/ml stieg die Expression von  $14,8 \pm 13,4 \%$  (24 Stunden) auf  $80,9 \pm 7,0 \%$  (96 Stunden) an. Die höchste Induktion der MHC Klasse II-Expression (von  $19,9 \pm 14,8 \%$  nach 24 Stunden auf  $91,0 \pm 6,0 \%$  nach 96 Stunden) fand bei einer

IFN- $\gamma$ -Konzentration von 500 U/ml statt. Die MHC Klasse II-Expression unbehandelter Zellen ( $6,0 \pm 0,3$  % nach 24 Stunden auf  $7,9 \pm 0,5$  % nach 96 Stunden) änderte sich in Abhängigkeit der Inkubationsdauer nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Stimulation der hRPE-Zellen mit IFN- $\gamma$  zu einer signifikanten Erhöhung ( $p \leq 0,05$ ) der MHC Klasse II-Expression auf deren Zelloberfläche in Abhängigkeit der IFN- $\gamma$ -Konzentration (hTERT-RPE1-Zellen: 50 U/ml bis 250 U/ml; hRPE-Zelllinie 3: 100 U/ml bis 500 U/ml) führte. Mit steigender Inkubationsdauer verminderte sich jedoch im Gegensatz zur hRPE-Zelllinie 3 bei den hTERT-RPE1-Zellen die Expression signifikant. Unstimulierte hRPE-Zellen wiesen ebenfalls eine Expression der MHC Klasse II-Antigene auf.

**Tabelle 5:** MHC Klasse II-Expression [%] von IFN- $\gamma$ -stimulierten hTERT-RPE1-Zellen und unbehandelten Zellen (Kontrolle) mittels FACS-Analyse (n=4).

IFN- $\gamma$ [U/ml]	MHC Klasse II-Expression [%]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	$0,9 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,9$	$0,6 \pm 0,4$
50	$60,3 \pm 9,7^*$	$50,6 \pm 11,8^*$	$36,7 \pm 9,8^*$	$6,5 \pm 2,3^*$
100	$80,6 \pm 3,7^*$	$72,3 \pm 3,4^*$	$54,6 \pm 2,1^*$	$9,2 \pm 1,9^*$
250	$86,1 \pm 2,5^*$	$83,4 \pm 2,3^*$	$63,6 \pm 1,3^*$	$11,2 \pm 3,4^*$

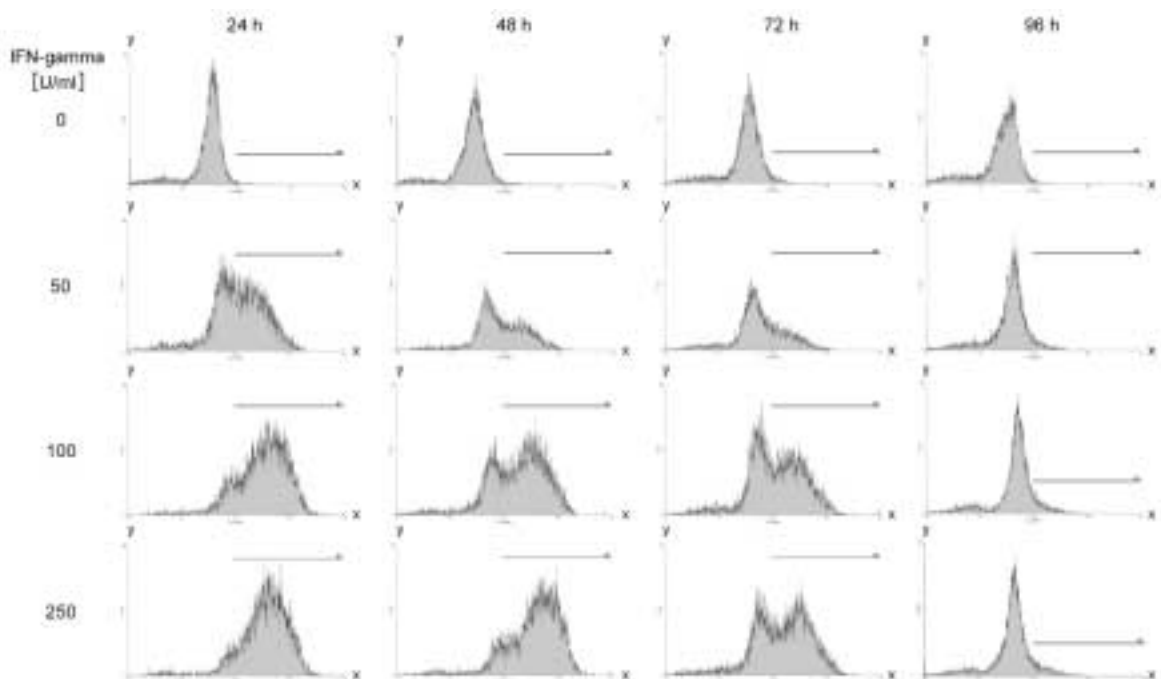
(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle

**Tabelle 6:** MHC Klasse II-Expression [%] von IFN- $\gamma$ -stimulierten hRPE-Zellen der Zelllinie 3 und unbehandelten Zellen (Kontrolle) mittels FACS-Analyse (n=4).

MHC Klasse II-Expression [%]				
IFN- $\gamma$ [U/ml]	24 h	48 h	72 h	96 h
0	6,0 $\pm$ 0,3	8,6 $\pm$ 3,7	8,2 $\pm$ 2,8	7,9 $\pm$ 0,5
100	6,5 $\pm$ 3,3	26,8 $\pm$ 12,1*	48,9 $\pm$ 8,9 *	61,9 $\pm$ 21,0*
250	14,8 $\pm$ 13,4 *	59,2 $\pm$ 18,9 *	73,8 $\pm$ 16,7*	80,9 $\pm$ 7,0*
500	19,9 $\pm$ 14,8*	71,8 $\pm$ 16,7*	89,3 $\pm$ 9,0*	91,0 $\pm$ 6,0*

(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle

In Abbildung 9 ist eine repräsentative FACS-Analyse (Histogramm) von hTERT-RPE1-Zellen dargestellt.



**Abbildung 9:** Histogramm von hTERT-RPE1-Zellen nach Färbung mit Phycoerythrin. Die Rot-Fluoreszenz FL-2 ist an der x-Achse aufgetragen, der Anteil fluoreszierender Zellen (MHC Klasse II-positive Zellen) ist durch den schwarzen Querbalken gekennzeichnet. Die y-Achse gibt die Anzahl der Zellen wieder. Die Abnahme der MHC Klasse II-positiven hRPE-Zellen mit zunehmender Expressionsdauer ist deutlich erkennbar.

## 4.5 Charakterisierung der transfizierten hRPE-Zellen

### 4.5.1 Einfluss der Transfektion mit pCIneoIL-10 auf die Vitalität der hRPE-Zellen

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl transfizierter Zellen wurde die Trypanblaufärbung verwendet. Dafür wurden hRPE-Zellen in 6er-Platten mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Kavität eingesät und nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C mit dem Plasmid pCIneoIL-10 transfiziert. Sowohl hTERT-RPE1-Zellen als auch Spender-hRPE-Zellen (hRPE-Zelllinien 1 und 2) wurden 24 Stunden nach der Transfektion auf ihre Vitalität untersucht. In Tab. 7 ist eine Zusammenfassung der Vitalitätsraten gegeben.

Die untransfizierten hTERT-RPE1-Zellen wiesen eine prozentuale Vitalitätsrate von  $98,1 \pm 1,1$  % (bei einer Probenanzahl von  $n=7$ ) auf. Die mit der Plasmid-DNA pCIneoLacZ transfizierten hTERT-RPE1-Zellen (Kontrolle für IL-10) zeigten einen Anteil lebender Zellen von  $98,5 \pm 2,6$  % (bei  $n=4$ ), die mit pCIneoIL-10 transfizierten Zellen zeigten eine vergleichbare Vitalität von  $96,9 \pm 4,3$  % (bei  $n=17$ ). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass mit pCIneoIL-10 und pCIneoLacZ transfizierte hTERT-RPE1-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu untransfizierten Zellen aufweisen.

Während die untransfizierten Spender-hRPE-Zellen einen prozentualen Anteil lebender Zellen von  $94,7 \pm 7,3$  % ( $n=7$ ) aufwiesen, zeigte die Gruppe der transfizierten Zellen auch hier keine signifikanten Unterschiede. Die Kontroll-hRPE-Zellen, die auch hier mit pCIneoLacZ transfiziert wurden, hatten einen Anteil vitaler Zellen von  $96,9 \pm 5,4$  % (bei  $n=4$ ); die mit dem Plasmid pCIneoIL-10 transfizierten hRPE-Zellen zeigten eine vergleichbare prozentuale Lebendzellzahl von  $95,7 \pm 5,9$  % ( $n=16$ ).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Transfektion die Vitalität der hTERT-RPE1-Zellen und der Spender-hRPE-Zellen nicht signifikant beeinflusst.

**Tabelle 7:** Vitalitätsraten [%] untransfizierter beziehungsweise transfizierter hRPE-Zellen. Zwischen transfizierten und untransfizierten hRPE-Zellen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Vitalitätsraten [%]			
	untransfiziert	pCIneoLacZ	pCIneoIL-10
hTERT-RPE1-Zellen	98,1 ± 1,1 (n=7)	98,5 ± 2,6 (n=4)	96,9 ± 4,3 (n=17)
Spender-hRPE-Zellen	94,7 ± 7,3 (n=7)	96,9 ± 5,4 (n=4)	95,7 ± 5,9 (n=16)

(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur untransfizierten Kontrolle

#### 4.5.2 Einfluss der Transfektion mit pCIneoIL-10 auf die Apoptose der hRPE-Zellen

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Transfektion von hTERT-RPE1-Zellen und Spender-hRPE-Zellen (hRPE-Zelllinie 2) einen Einfluss auf den natürlichen Zelltod, die sogenannte Apoptose, und auf die sekundäre Nekrose hat (siehe auch Kapitel 3.2.2.6). Dafür wurden  $4 \times 10^4$  Zellen/Kavität in 12er-Zellkulturplatten eingesät und nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C mit dem Plasmid pCIneoIL-10 transfiziert. Für die Transfektion wurden verschiedene FuGENE™ 6: DNA-Verhältnisse verwendet. Dabei handelte es sich um ein 3:1- (0,9 µl FuGENE™ 6, 0,3 µg DNA) beziehungsweise 3:2-Verhältnis, wobei letzteres in einer niedrigen (3:2<sup>a</sup>) und einer höheren (3:2<sup>b</sup>) Konzentration gewählt wurde. 1,8 µl FuGENE™ 6 und 1,2 µg DNA entsprachen dem Verhältnis von 3:2<sup>a</sup> sowie 3,6 µl FuGENE™ 6 und 2,4 µg DNA dem Verhältnis 3:2<sup>b</sup>. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Nach 5 beziehungsweise 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen anhand der FACS-Analyse auf Apoptose und sekundäre Nekrose untersucht. Sowohl die hTERT-RPE1-Zellen als auch die Spender-hRPE-Zellen wiesen keinerlei signifikanten Unterschiede zu den Werten der unbehandelten Kontrolle auf. In den Tabellen 8 und 9 sind die einzelnen Apoptoseraten von trans-

fizierten und untransfizierten hTERT-RPE1-Zellen (Tab. 8) beziehungsweise Zellen der hRPE-Zelllinie 2 (Tab. 9) nach unterschiedlichen Zeitpunkten aufgeführt.

Bei den hTERT-RPE1-Zellen wies die Kontrolle nach 5 Stunden eine Apoptoserate von  $16,4 \pm 7,2$  % auf. Diejenigen hRPE-Zellen, die im Verhältnis 3:1 transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den übrigen transfizierten Zellen die höchste Apoptoserate mit  $14,6 \pm 3,6$  %. Bei beiden FuGENE™ 6:DNA-Verhältnissen von 3:2 lag der prozentuale Anteil bei  $7,6 \pm 0,5$  % (3:2<sup>a</sup>) und  $5,6 \pm 2,1$  % (3:2<sup>b</sup>). Nach 24 Stunden wurde für die Kontrolle ein prozentualer Anteil apoptotischer Zellen von  $27,3 \pm 14,1$  % gemessen. Die transfizierten Zellen zeigten untereinander ähnliche Werte, die bei  $10,7 \pm 10,1$  % (3:2<sup>a</sup>),  $8,1 \pm 6,9$  % (3:2<sup>b</sup>) und  $11,0 \pm 9,3$  % (3:1) lagen.

Der Testansatz wurde parallel mit der hRPE-Zelllinie 2 durchgeführt. Die Kontrolle wies nach 5 Stunden eine Apoptoserate von 28,6 % auf, nach 24 Stunden lag der Wert bei 12,6 %. Die Werte der transfizierten Zellen in Bezug zur jeweiligen Kontrolle wiesen ähnlich wie bei den hTERT-RPE1-Zellen keine signifikanten Unterschiede auf. Bei einem FuGENE™ 6:DNA-Verhältnis von 3:1 wurde eine Apoptoserate von 32,9 % (nach 5 Stunden) beziehungsweise 3,0 % (nach 24 Stunden) ermittelt. Werte von 9,2 % (5 Stunden) und 14,9 % (24 Stunden) konnten bei dem Verhältnis 3:2<sup>a</sup> gemessen werden. Bei 3:2<sup>b</sup> lagen Apoptoseraten von 12,3 % (5 Stunden) und 3,0 % (24 Stunden) vor.

Zusammenfassend lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Transfektion und Apoptose sowohl bei den hTERT-RPE1-Zellen als auch bei der hRPE-Zelllinie 2 erkennen. Somit wird die Apoptose bei den hRPE-Zellen durch die Transfektion nicht erhöht!

**Tabelle 8:** Apoptoserate [%] mit dem Plasmid pCIneoIL-10 transfizierter und untransfizierter hTERT-RPE1-Zellen nach 5 Stunden und 24 Stunden mittels FACS-Analyse (n=2). Zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen existiert kein signifikanter Unterschied.

Apoptoserate [%]		
FuGENE™6-DNA-Verhältnis	5 h	24 h
Kontrolle	16,4 ± 7,2	27,3 ± 14,1
3:1	14,6 ± 3,6	11,0 ± 9,3
3:2 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,5	10,7 ± 10,1
3:2 <sup>b</sup>	5,6 ± 2,1	8,1 ± 6,9

(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle

**Tabelle 9:** Apoptoserate [%] transfizierter (pCIneoIL-10) und untransfizierter Zellen der hRPE-Zelllinie 2 nach 5 Stunden und 24 Stunden mittels FACS-Analyse. Kein signifikanter Unterschied zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen.

Apoptoserate [%]		
FuGENE™6-DNA-Verhältnis	5 h	24 h
Kontrolle	28,6	12,6
3:1	32,9	3,0
3:2 <sup>a</sup>	9,2	14,9
3:2 <sup>b</sup>	12,3	3,0

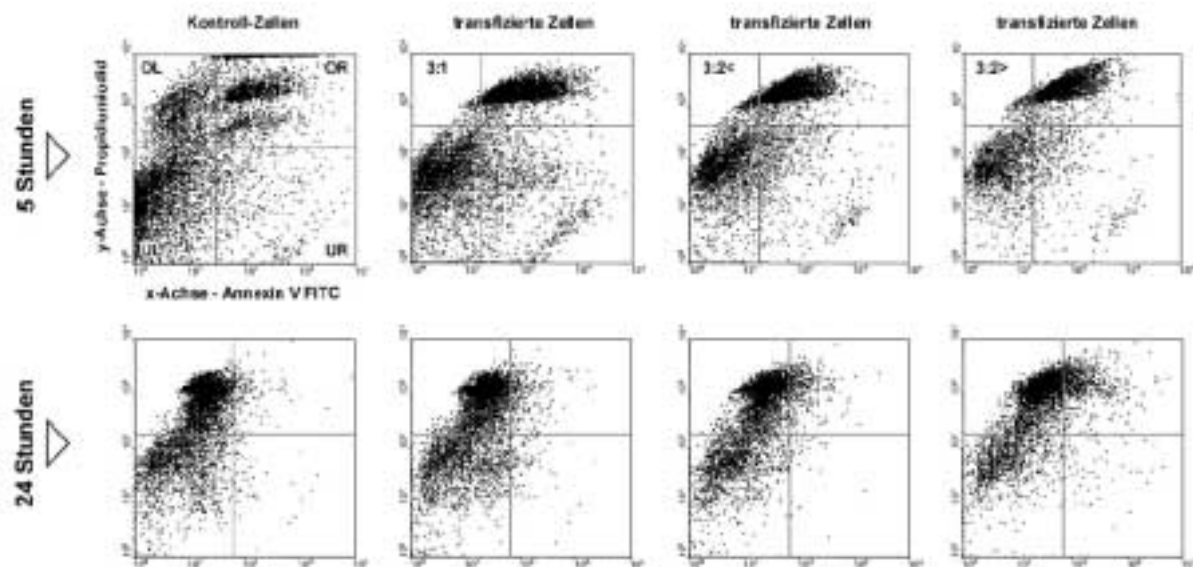
(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle

Nach 5 Stunden wiesen die Kontroll-hTERT-RPE1-Zellen einen Anteil sekundär nekrotischer Zellen von  $38,3 \pm 15,4$  % (n=3) auf. Die transfizierten Zellen zeigten Werte von  $44,7 \pm 1,3$  % (FuGENE™6-DNA-Verhältnis von 3:1; n=2),  $44,8 \pm 8,0$  % (3:2<sup>a</sup>; n=3) und  $57,9 \pm 0,2$  % (3:2<sup>b</sup>; n=2). Nach 24 Stunden lag der Anteil sekundär nekrotischer Zellen bei  $19,6 \pm 14,3$  % (3:1; n=2),  $20,8 \pm 14,3$  % (3:2<sup>a</sup>; n=3) und

26,2 ± 11,4 % (3:2<sup>b</sup>; n=2). Die Kontrolle zeigte einen Wert von 12,4 ± 11,1 % (n=3).

Der Testansatz wurde parallel mit der hRPE-Zelllinie 2 durchgeführt. Die Kontrolle wies nach 5 Stunden eine sekundäre Nekrose-Rate von 18,8 % auf, nach 24 Stunden lag der Wert bei 10,3 %. Bei einem FuGENE™6:DNA-Verhältnis von 3:1 wurde ein prozentualer Anteil sekundär nekrotischer Zellen von 16,6 % (nach 5 Stunden) beziehungsweise 10,4 % (nach 24 Stunden) ermittelt. Werte von 30,2 % (nach 5 Stunden) beziehungsweise 10,9 % (nach 24 Stunden) konnten bei dem Verhältnis 3:2<sup>a</sup> gemessen werden. Bei einem FuGENE™6:DNA-Verhältnis von 3:2<sup>b</sup> waren nach 5 Stunden 28,6 % der Zellen sekundär nekrotisch, nach 24 Stunden lag der prozentuale Anteil bei 14,8 %.

In Abb. 10 ist eine repräsentative FACS-Analyse (*dotplots*) von hTERT-RPE1-Zellen dargestellt.



**Abbildung 10:** Dotplots von hTERT-RPE1-Zellen nach Färbung mit Annexin V FITC und Propidiumiodid. Im Quadranten UL sind die vitalen Zellen, im Quadranten UR die apoptotischen und im Quadranten OR die sekundär nekrotischen Zellen dargestellt.



## **4.6 Wirkung IL-10-transfizierter hRPE-Zellen auf die T-Lymphozytenproliferation**

Zur Prüfung der Wirkung IL-10-transfizierter hRPE-Zellen auf die T-Lymphozytenproliferation wurden zunächst hRPE-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit ca.  $3 \times 10^5$  Zellen (hTERT-RPE1-Zellen) beziehungsweise  $9 \times 10^6$  Zellen (Spender-hRPE-Zellen) angesetzt und über 4 Tage mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (50 U/ml, 100 U/ml, 250 U/ml) stimuliert. Stimulierte und unstimulierte Zellen wurden danach in 96er-Kulturplatten mit einer Dichte von 7500 Zellen/Kavität eingesät und nach ca. 18-stündiger Inkubation bei 37°C mit der Plasmid-DNA pCIneoIL-10 transfiziert. Nachdem T-Lymphozyten alleine beziehungsweise zusammen mit Makrophagen als professionelle APC auf die hRPE-Zellen gebracht wurden, inkubierten die Zellkulturplatten für eine Dauer von 2 bis 6 Tagen bei 37°C. Die Auswertung der T-Lymphozytenproliferation erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten mittels MTT-Test (siehe Kapitel 3.2.2.8). Aufgrund des frühzeitigen Absterbens der hRPE-Zellen wurde der Untersuchungszeitraum bei den hTERT-RPE1-Zellen auf 2 bis 6 Tage, bei den Spender-hRPE-Zellen (hRPE-Zelllinien 1 und 2) auf 2 bis 4 Tage beschränkt. Aus demselben Grund konnten diese Versuche bei den Spender-hRPE-Zellen nur in Anwesenheit von Makrophagen erfolgreich durchgeführt werden.

### **4.6.1 Supprimierung der T-Zellproliferation durch IL-10 ohne APC**

Durch die Transfektion mit dem Plasmid pCIneoIL-10 exprimierten die hTERT-RPE1-Zellen aufgrund des eingebauten Gens das Zytokin IL-10, das signifikant die T-Lymphozytenproliferation unterdrückte. Die Supprimierung der T-Zellproliferation war sowohl bei den mit IFN- $\gamma$ -stimulierten Zellen als auch bei den unbehandelten Zellen ähnlich, so dass keine Korrelation zwischen der hRPE-T-Zell-Aktivierung und der Reduktion der T-Lymphozytenproliferation bestand. In Tab. 10 sind die einzelnen Werte der T-Lymphozytenproliferation unter Berücksichtigung des Beobachtungszeitraumes und der IFN- $\gamma$ -Konzentration angegeben.

Am Tag 6 wurde die T-Zellproliferation signifikant gehemmt. Dies war beispielsweise bei den unbehandelten hTERT-RPE1-Zellen der Fall (Reduktion auf  $28,5 \pm 2,4$  % des Kontrollwertes). Ein ähnlicher Suppressionseffekt war bei den mit IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen zu beobachten, wobei bei einer Konzentration von 50 U/ml insgesamt der stärkste T-Lymphozytenrückgang gemessen werden konnte (Verminderung auf  $14,1 \pm 1,1$  % des Kontrollwertes).

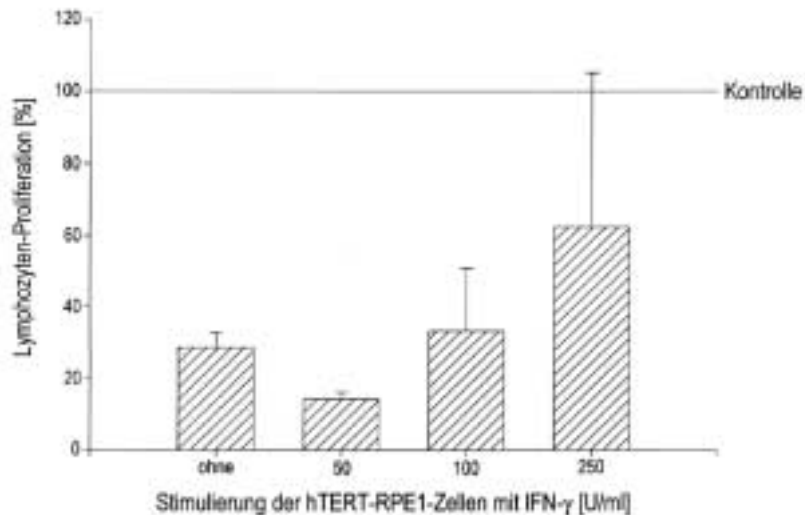
Zusammenfassend lässt sich eine Reduktion der T-Lymphozytenproliferation nach vorheriger Transfektion der hTERT-RPE1-Zellen erkennen, die unabhängig von einer Aktivierung der hTERT-RPE1-Zellen war und zudem innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes bestand.

**Tabelle 10:** Lymphozytenproliferation [%] nach Kokultivierung von IFN- $\gamma$ -stimulierten und mit pCneoIL-10 transfizierten hTERT-RPE1-Zellen. Messung mittels MTT-Test (n=3).

T-Lymphozytenproliferation [%]					
IFN- $\gamma$ [U/ml]	2 d	3 d	4 d	5 d	6d
0	$96,3 \pm 2,8$	$81,3 \pm 10,6$	$92,7 \pm 1,4$	$36,3 \pm 3,8$	$28,5 \pm 2,4^*$
50	$97,9 \pm 1,0$	$95,1 \pm 5,6$	$90,0 \pm 2,5$	$36,6 \pm 4,1$	$14,1 \pm 1,1^*$
100	$94,1 \pm 1,2$	$90,2 \pm 3,4$	$97,3 \pm 0,1$	$46,2 \pm 7,9$	$33,2 \pm 10,1^*$
250	$93,0 \pm 1,3$	$90,8 \pm 7,3$	$92,6 \pm 5,9$	$50,7 \pm 8,6$	$62,4 \pm 24,7$

(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur untransfizierten Kontrolle [100 %]

Signifikanzen zeichneten sich am Tag 6 ab. In Abb. 11 ist die Reduktion der T-Lymphozytenproliferation als Verlauf graphisch dargestellt.



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der signifikanten Supprimierung der T-Lymphozyten-proliferation am Tag 6 nach Kokultivierung von IFN- $\gamma$ -stimulierten und mit pCneoIL-10 transfizierten hTERT-RPE1-Zellen.

#### 4.6.2 Supprimierung der T-Zellproliferation durch IL-10 mit APC

Zusätzlich wurden die T-Lymphozyten mit Makrophagen als professionelle APC desselben Spenders kokultiviert. In diesem Fall wurden die Ergebnisse der hTERT-RPE1-Zellen mit denen der Spender-hRPE-Zellen (hRPE-Zellen der Zelllinien 1 und 2) verglichen. Die Messungen fanden wiederum zwischen Tag 2 und 6 (hTERT-RPE1-Zellen) beziehungsweise zwischen Tag 2 und 4 (Spender-hRPE-Zellen) statt. Die einzelnen Werte der hTERT-RPE1-Zellen sind in Tab. 11, diejenigen der Spender-hRPE-Zellen in Tab. 12 aufgeführt.

Im Falle der immortalisierten Permanent-Zelllinie (hTERT-RPE1-Zellen) nahm die T-Zellzahl durch die Transfektion der hRPE-Zellen mit dem IL-10-Gen sowohl am Tag 5 als auch am Tag 6 signifikant ab. Allerdings existierte auch hier kein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen und der Suppressionsstärke. Am Tag 5 lagen die Werte zwischen  $39,9 \pm 14,7 \%$  (100 U/ml) und  $46,2 \pm 7,3 \%$  (50 U/ml) der Kontrolle; die unstimulierten und die mit 250 U/ml IFN- $\gamma$ -stimulierten Zellen zeigten mittlere Werte von  $44,1 \pm 4,9 \%$  beziehungsweise  $44,3 \pm 5,6 \%$  der Kontrolle. Am Tag 6 waren lediglich die Werte

der unbehandelten Zellen und diejenigen mit der niedrigsten IFN- $\gamma$ -Konzentration (50 U/ml) signifikant unterschiedlich: es wurde eine Suppression der T-Lymphozyten auf  $35,3 \pm 11,5$  % (ohne IFN- $\gamma$ ) und  $37,4 \pm 6,3$  % (50 U/ml) des Kontrollwertes gemessen.

Bei den Spender-hRPE-Zellen zeigten sich ebenfalls Signifikanzen, jedoch aufgrund des frühzeitigen Absterbens der Zellen bereits am Tag 3 und 4. Die signifikanten Ergebnisse beschränkten sich bei beiden Tagen jeweils auf die unbehandelten Zellen und diejenigen mit der höchsten IFN- $\gamma$ -Konzentration (250 U/ml). Dies bedeutete, dass am Tag 3 eine Suppression der T-Lymphozytenproliferation auf  $71,4 \pm 6,7$  % (ohne IFN- $\gamma$ ) und auf  $68,1 \pm 1,6$  % (250 U/ml) der Kontrolle vorlag. Am Tag 4 beobachteten wir einen Proliferationsrückgang auf  $59,3 \pm 4,4$  % (ohne IFN- $\gamma$ ) der Kontrolle beziehungsweise bei denjenigen Zellen, die zuvor mit IFN- $\gamma$  in einer Konzentration von 250 U/ml behandelt wurden zeigte die T-Zellproliferation eine Suppression auf  $63,3 \pm 4,5$  % des Kontrollwertes.

Zusammenfassend lässt sich auch mit Makrophagen als professionelle APC eine Reduktion der T-Zellproliferation sowohl bei den hTERT-RPE1-Zellen als auch bei den Spender-hRPE-Zellen beobachten, die wiederum bei beiden Zelllinien zu den verschiedenen Zeitpunkten und unabhängig von der Aktivierung mit IFN- $\gamma$  auftrat.

**Tabelle 11:** T-Lymphozytenproliferation [%] nach Kokultivierung von IFN- $\gamma$ -stimulierten hTERT-RPE1-Zellen nach Transfektion mit pCIneoIL-10. Messung mittels MTT-Test (n=4).

T-Lymphozytenproliferation [%]					
IFN- $\gamma$ [U/ml]	2 d	3 d	4 d	5 d	6d
0	$96,0 \pm 0,9$	$82,3 \pm 3,7$	$82,8 \pm 2,1$	$44,1 \pm 4,9^*$	$35,3 \pm 11,5^*$
50	$94,8 \pm 3,1$	$82,3 \pm 0,9$	$87,6 \pm 2,8$	$46,2 \pm 7,3^*$	$37,4 \pm 6,3^*$
100	$96,7 \pm 3,1$	$84,7 \pm 1,9$	$82,0 \pm 6,7$	$39,9 \pm 14,7^*$	$52,9 \pm 17,7$
250	$94,9 \pm 1,3$	$85,1 \pm 2,7$	$77,8 \pm 7,7$	$44,3 \pm 5,6^*$	$60,2 \pm 22,5$

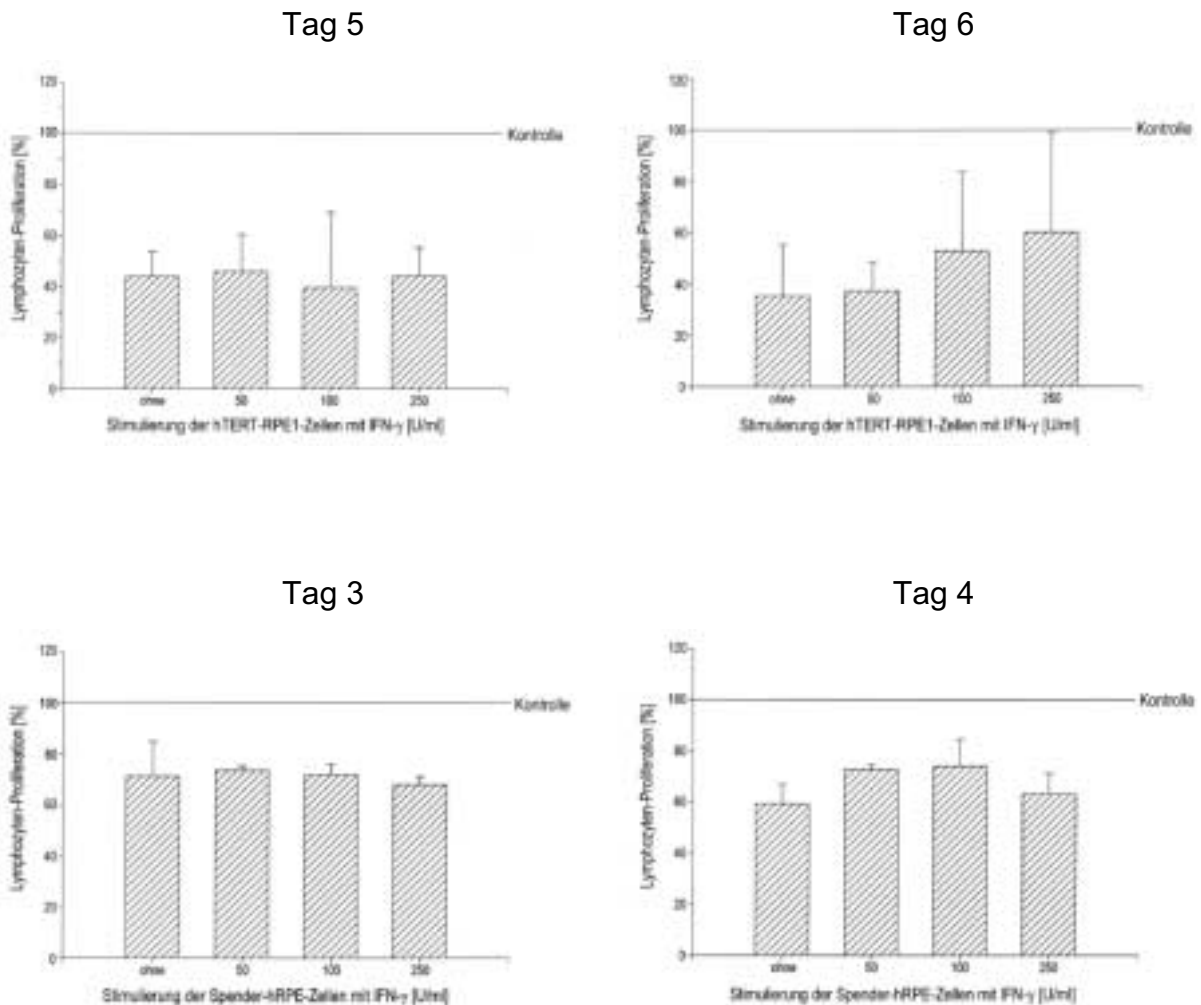
(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur untransfizierten Kontrolle [100 %]

**Tabelle 12:** T-Lymphozytenproliferation [%] nach Kokultivierung von IFN- $\gamma$ -stimulierten Spender-hRPE-Zellen nach Transfektion mit pCIneoIL-10. Messung mittels MTT-Test (n=4).

T-Lymphozytenproliferation [%]			
IFN- $\gamma$ [U/ml]	2 d	3 d	4 d
0	85,7 $\pm$ 2,2	71,4 $\pm$ 6,7*	59,3 $\pm$ 4,4*
50	85,0 $\pm$ 1,4	73,7 $\pm$ 0,9	72,9 $\pm$ 0,9
100	84,3 $\pm$ 1,6	72,0 $\pm$ 2,0	74,2 $\pm$ 6,1
250	86,6 $\pm$ 2,1	68,1 $\pm$ 1,6*	63,3 $\pm$ 4,5*

(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur untransfizierten Kontrolle [100 %]

Bei den immortalisierten hRPE-Zellen (hTERT-RPE1-Zellen) waren die Ergebnisse der Tage 5 und 6, bei den Spender-hRPE-Zellen die Tage 3 und 4 signifikant unterschiedlich; der Verlauf ist in Abb. 12 dargestellt.



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der signifikanten Supprimierung der T-Lymphozytenproliferation nach Kokultivierung von IFN-γ stimulierten und mit pCIneoIL-10 transfizierten hTERT-RPE1-Zellen (Tag 5 und 6) beziehungsweise Spender-hRPE-Zellen (Tag 3 und 4).

#### 4.7 Hemmung der IL-10-Wirkung durch Zugabe von Anti-IL-10-Antikörpern

Die mittels ELISA gemessenen IL-10-Konzentrationen waren die Grundlage zur Bestimmung der eingesetzten Konzentration der neutralisierenden Anti-IL-10-Antikörper für die Hemmung der Interleukinwirkung. Dazu wurden zunächst hRPE-Zellen mit einer Dichte von 7500 Zellen/Kavität in 96er-Platten eingesät und nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C mit dem Plasmid pCIneoIL-10 transfiziert (mit Ausnahme der Kontrolle). Anti-IL-10-Antikörper wurden entsprechend des gemessenen IL-10-Maximums von ca. 10 ng/ml (bei hTERT-RPE1-Zellen) nach der Transfektion im Überschuss in einer Konzentration von 1µg/ml (100-fach) zuge-

geben. Die Auswertung der hRPE-Zellproliferation erfolgte mittels MTT-Test nach einer Inkubationsdauer von 2, 3 beziehungsweise 4 Tagen. In Tab. 13 sind die ermittelten Werte im Überblick dargestellt.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Quotient aus den MTT-Test-Ergebnissen einerseits und den transfizierten Zellen ohne Zugabe von Anti-IL-10 (nachfolgend benannt als Gruppe A) gebildet. Zu erwarten wäre, dass in der Gruppe A Werte von deutlich (signifikant) über 100% ermittelt werden, da die hinzugefügten IL-10-Antikörper das von den hRPE-Zellen gebildete IL-10 neutralisieren.

Bei der immortalisierten Zelllinie (hTERT-RPE1-Zellen) zeigte die Gruppe A an den Tagen 3 beziehungsweise 4 signifikante Unterschiede zur untransfizierten Kontrolle mit Werten von  $119,9 \pm 1,6$  % beziehungsweise  $122,1 \pm 2,4$  %, wobei gleichzeitig eine steigende Tendenz auf den Tag 4 erkennbar war. Keine Signifikanz zur Kontrolle lag am Tag 2 mit  $101,3 \pm 1,8$  % vor.

Die Ergebnisse der Spender-hRPE-Zellen (hRPE-Zelllinien 1 und 2) wiesen an allen untersuchten Tagen signifikante Unterschiede zur untransfizierten Kontrolle auf. Die Werte lagen bei  $118,5 \pm 2,3$  % (Tag 2),  $136,3 \pm 2,1$  % (Tag 3) beziehungsweise bei  $143,1 \pm 5,7$  % (Tag 4).

Der Quotient aus den MTT-Test-Ergebnissen und der untransfizierten Kontrolle ist nachfolgend als Gruppe B benannt. Zu erwarten wären Werte um die 100 % (nicht signifikant), da durch die neutralisierenden Antikörper die Wirkung von IL-10 aufgehoben wird und untransfizierte hRPE-Zellen kein IL-10 synthetisieren. Die T-Zellproliferation sollte demnach nicht beeinflusst werden.

Bei den hTERT-RPE1-Zellen wurden Werte ermittelt, die am Tag 2 ( $99,7 \pm 1,1$  %), Tag 3 ( $99,8 \pm 1,2$  %) beziehungsweise Tag 4 ( $100,1 \pm 0,8$  %) keine Signifikanzen zur untransfizierten Kontrolle aufwiesen.

Die Ergebnisse der Spender-hRPE-Zellen zeigten ebenfalls keine Signifikanzen zur Kontrolle am Tag 2 ( $99,7 \pm 0,2 \%$ ) beziehungsweise Tag 4 ( $91,0 \pm 4,6 \%$ ). Lediglich am Tag 3 ( $94,5 \pm 2,3 \%$ ) lag eine Signifikanz zur Kontrolle vor.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die zugegebenen IL-10-Antikörper sowohl bei den hTERT-RPE1-Zellen als auch bei den hRPE-Zelllinien 1 und 2 zu einer Hemmung der Suppressionswirkung des IL-10 führten.

**Tabelle 13:** Einfluss von Anti-IL-10-Antikörpern (Anti-IL-10) auf die T-Lymphozytenproliferation nach Kokultivierung mit pCIneoIL-10 transfizierter hRPE-Zellen [%]. Messung mittels MTT (n=8).

Gruppe A: mit pCIneoIL-10 transfizierte hRPE-Zellen plus Anti-IL-10 in Relation zu transfizierten (pCIneoIL-10) hRPE-Zellen

Gruppe B: mit pCIneoIL-10 transfizierte hRPE-Zellen plus Anti-IL-10 in Relation zu untransfizierten hRPE-Zellen

T-Lymphozytenproliferation [%] nach Anti-IL-10-Einfluss			
	2d	3d	4d
<b>hTERT-RPE1-Zellen</b>			
Gruppe A			
Gruppe B	$101,3 \pm 1,8$	$119,9 \pm 1,6^*$	$122,1 \pm 2,4^*$
	$99,7 \pm 1,1$	$99,8 \pm 1,2$	$100,1 \pm 0,8$
<b>Spender-hRPE-Zellen</b>			
Gruppe A			
Gruppe B	$118,5 \pm 2,3^*$	$136,3 \pm 2,1^*$	$143,1 \pm 5,7^*$
	$99,7 \pm 0,2$	$94,5 \pm 2,3^*$	$91,0 \pm 4,6$

(\*) signifikant mit  $p \leq 0,05$  zur untransfizierten Kontrolle [100 %]



## 5 Diskussion

Die Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist verbunden mit einer Degeneration von retinalen Pigmentepithelzellen und folglich mit einer Degeneration von Photorezeptoren (PENFOLD et al. 1986; BRESSLER et al. 1988 a; SARKS u. SARKS 1994). Die daraus resultierende zentrale Erblindung konnte bisher mit verschiedenen Therapiemethoden wie Laserkoagulation (MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP 1982, 1986 a, b, 1990), Photodynamische Therapie (DONATI et al. 1999; WU u. MURPHY 1999; MICHELS et al. 2000; SCHMIDT-ERFURTH u. LAQUA 2001) und subretinale Chirurgie (DEJUAN u. MACHEMER 1988; BLINDER et al. 1991; BERGER u. KAPLAN 1992; LAMBERT et al. 1992; THOMAS et al. 1992; HUDSON et al. 1995) nicht langfristig verbessert werden.

Die Transplantation als ein weiterer möglicher Therapieansatz konnte im Tiermodell (LI u. TURNER 1988 b; CRAFOORD et al. 1999) beziehungsweise am Patienten (ALGVERE et al. 1994; GOURAS u. ALGVERE 1996; ALGVERE et al. 1997, 1999) bisher technisch erfolgreich durchgeführt werden. Der limitierende Faktor war jedoch in allen Fällen eine Abstoßungsreaktion des RPE-Zell-Transplantates.

Die systemische Immunsuppression stellt gegenwärtig bei Transplantationspatienten die einzige Möglichkeit dar, transplantierte Gewebe oder Organe vor einer Abstoßungsreaktion zu schützen. Da die entsprechenden Pharmaka nach der Transplantation ein Leben lang verabreicht werden müssen, stellen die verschiedenen Nebenwirkungen, wie beispielsweise Nephrotoxizität, Hepatotoxizität und Hypertension ein ernst zu nehmendes Risiko für den Patienten dar (BELIN et al. 1990).

Durch den lokalen Einsatz immunsuppressiver Zytokine könnten diese schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen verhindert werden.

Bekanntestes physiologisches Immunsuppressivum ist TGF- $\beta$ . Es wirkt regulierend beim Entzündungsgeschehen und bei der Wundheilung (WAHL et al. 1989; RODLAND et al. 1990; AMENTO u. BECK 1991) und weist außerdem immunmodulatorische Eigenschaften (RODLAND et al. 1990; LUCAS et al. 1991; WEI u.

JONAKAIT 1999) auf. QIN und Mitarbeiter wiesen 1995 (1995 a, b) im Mäusemodell die immunsuppressiven und damit transplantaterhaltenden Eigenschaften von TGF- $\beta$  erfolgreich nach. Obwohl TGF- $\beta$  ein stärkeres immunsuppressives Potential als IL-10 aufweist (ENZMANN et al. 1999 b), kann ein Einsatz dieses Zytokins in der Augenheilkunde aufgrund eines möglichen Zusammenhanges mit der Proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) (CONNER et al. 1989) nicht in Betracht gezogen werden. Bei dieser Augenerkrankung handelt es sich im weiteren Sinne um eine überschießende Geweberegeneration. Dieser fibrotische Prozess, dessen auslösende Faktoren noch ungeklärt sind, basiert u.a. auf einer erhöhten TGF- $\beta$ -bedingten Fibronektinbildung und vermehrten Fibroblastenanhäufung (WELLER et al. 1990; WIEDEMANN 1992).

IL-10 ist ebenfalls bekannt dafür, immunsuppressive Eigenschaften zu besitzen. Es wurde 1989 erstmals identifiziert und aufgrund seiner damals beobachteten Eigenschaft, die Zytokinsynthese bestimmter T-Zellen zu hemmen, ursprünglich als *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF - FIORENTINO et al. 1989) bezeichnet. Es wird von verschiedenen Zellarten, wie beispielsweise T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC), gebildet (BROMBERG 1995; DEVRIES 1995; TUYT et al. 1997).

IL-10 als immunsuppressives Zytokin beeinflusst sowohl die Zytokinsynthese der T-Lymphozyten als auch die der Makrophagen. Es reduziert beispielsweise die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Synthese von T-Zellen, so dass folglich deren antigenspezifische Proliferation verhindert wird (FIORENTINO et al. 1989; DEWAAL MALEFYT et al. 1991 b; MOSMANN u. MOORE 1991; BEJARANO et al. 1992; DEWAAL MALEFYT et al. 1992; DELPRETE et al. 1993; DEWAAL MALEFYT et al. 1993; TAGA et al. 1993; BROMBERG 1995; DEVRIES 1995; MOTTRAM et al. 1995). Durch die herabgesetzte Synthese von IFN- $\gamma$  wird die antigenpräsentierende Kapazität von Makrophagen durch Verminderung der MHC Klasse II-Expression reduziert (TAGA et al. 1993). Zusätzlich inhibiert IL-10 die Zytokinsynthese von Makrophagen, wie beispielsweise diejenige von TNF- $\alpha$  (WANG et al. 1995; LENTSCH et al. 1997), IL-1 $\beta$  (COLLART et al. 1990; HISCOTT et al. 1993; WANG et al. 1995), IL-6 und IL-8 (DEWAAL MALEFYT et al. 1991 a; FIORENTINO et al. 1991; TUYT et al. 1997). Dies erfolgt auf transkriptioneller Ebene. Die Transloka-

tion des Transkriptionsfaktors *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) in den Zellkern wird verhindert und somit die Zytokinen-Transkription blockiert (WANG et al. 1995). NF- $\kappa$ B ist außerdem verantwortlich für die Expression verschiedener Gene in hRPE-Zellen, wie beispielsweise pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1), Chemokine (*regulates on activation normal T-cell expressed and secreted* - RANTES; *monocyte chemotactic protein-1* - MCP-1) (WANG et al. 1999), Zelladhäsionsmoleküle (*intercellular cell adhesion molecule-1* - ICAM-1) und Wachstumsfaktoren (*macrophage colony stimulating factor* - M-CSF) (WANG et al. 1999; COLLINS et al. 1995).

Zusätzlich vermittelt IL-10 seine Wirkung über den sogenannten Jak-Stat-Signaltransduktionsweg durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Stat 1 und Stat 3 (O'FARRELL et al. 1998; WEBER-NORDT et al. 1999). Dadurch wird die Wirkung von IFN- $\gamma$  blockiert und somit eine verstärkte MHC Klasse II-Expression verhindert (O'FARRELL et al. 1998).

IL-10 verhindert also indirekt die antigenspezifische T-Zellaktivierung, die mit einer Verminderung der Antigenpräsentation und einer Verminderung der Funktionen von Makrophagen assoziiert ist (DEVRIES 1995).

Das IL-10-Protein besteht aus 160 Aminosäuren (DEVRIES 1995; TUYT et al. 1997) und weist ein Molekulargewicht von ca. 18 kDa auf (HOWARD u. O'GARRA 1992; DEVRIES 1995). Die Polypeptidketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft (HO u. MOORE 1994; TUYT et al. 1997).

*In vivo*-Studien über die verlängerte Transplantat-Toleranz von Mäuseherzen (DEBRUYNE et al. 1998) und Rattenlebern (SHINOZAKI et al. 1999) belegen die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 (QIN et al. 1995, 1996).

Das Einbringen von Zytokinen in das Auge mit einer resultierenden lokalen Immunsuppression kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine subretinale Injektion beispielsweise wird zwar erfolgreich durchgeführt, das Krankheitsgeschehen kann jedoch aufgrund der fehlenden kontinuierlichen Bereitstellung

des Zytokins lediglich für eine gewisse Zeit hinausgezögert werden (FAKTOROVICH et al. 1990).

Bei der Gentherapie wird das Gen für das entsprechende Zytokin zusammen mit einem Vektor in die Zielzelle eingeschleust (Transfektion). Dadurch kann das von der transfizierten Zelle exprimierte Protein kontinuierlich über einen längeren Zeitraum an die Umgebung abgegeben werden (KNECHTLE et al. 1996). Es wird zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren unterschieden.

Virale Vektoren sind zusammengesetzt aus einem viralen Genom und dem therapeutischen Gen. Eingesetzt werden zur Genübertragung hauptsächlich das Retrovirus (MULLIGAN 1993; JOLLY 1994; QIN et al. 1995, 1996; KNECHTLE et al. 1996), das Adenovirus (QUANTIN et al. 1992; MULLIGAN 1993; JOLLY 1994; TRAPNELL u. GORZIGLIA 1994; YEI et al. 1994; KNECHTLE et al. 1996; SHINOZAKI et al. 1999) und das Herpesvirus (MULLIGAN 1993; JOLLY 1994; QIN et al. 1995; KNECHTLE et al. 1996). Der Vorteil der Viren liegt vor allem in der hohen Transfektionseffizienz, die durch den virustypischen Infektionsmechanismus bedingt ist. Damit in Zusammenhang steht auch die vergleichbar höhere Expression und Proteinsynthese des erwünschten Produktes. Nachteile sind jedoch die immunologische und genetische Unsicherheit (QUANTIN et al. 1992; MULLIGAN 1993; JOLLY 1994; TRAPNELL u. GORZIGLIA 1994; CRYSTAL 1995).

Nicht-virale Vektoren, die bereits in den 70er Jahren bekannt waren, haben den Vorteil, leicht anwendbar zu sein, keine immunologischen Reaktionen auszulösen und keine genetischen Veränderungen hervorzurufen. Von Nachteil sind jedoch, verglichen mit viralen Vektoren, die geringere Transfektionseffizienz (LEDLEY 1994; CRYSTAL 1995). Die von manchen Autoren ebenfalls zu den Nachteilen gezählte transiente Genexpression (LEDLEY 1994; CRYSTAL 1995) ist in unserem Falle von Vorteil. Die im Rahmen der Pathophysiologie der AMD zerstörte Blut-Retina-Schranke regeneriert sich nach einer gewissen Zeit wieder, so dass eine transiente IL-10-Expression ausreichend erscheint. Für die Übertragung der nicht-viralen Vektoren in die Empfängerzellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Dazu zählen beispielsweise die Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran-

Methode, die Kalziumphosphat-Präzipitation, die Elektroporation, die kationischen Lipide und aktivierten Dendrimere.

Die erste Methode, die in den 60er Jahren entwickelt wurde, um DNA im großen Maßstab in Zellen einzuschleusen, war die Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran-Methode, bei der sich die DNA über ihre negativ geladenen Phosphatgruppen an den positiv geladenen DEAE-Dextran-Komplex bindet. Die dadurch gebildeten Partikel „kleben“ an der Oberfläche der Zellen und werden über Endozytose aufgenommen (WATSON et al. 1993).

1973 wurde erstmals die Kalziumphosphat-Präzipitation von GRAHAM und VANDER EB beschrieben. Hier wird die mit diesem Salz präzipitierte DNA *ex vivo* auf Zellen in Kultur verbracht. Mit Hilfe der Endozytose gelangt dieses Konjugat in das Zellinnere (GRAHAM u. VANDER EB 1973; LEDLEY 1994; QIN et al. 1994; KNECHTLE et al. 1996).

Bei der Elektroporation, die 1982 zuerst von NEUMANN und Mitarbeitern beschrieben wurde, werden die Zellen zusammen mit der DNA in eine Puffer-Lösung überführt und anschließend einem elektrischen Feld mit hoher Spannung ausgesetzt. Dadurch bilden sich in der Zellmembran Poren, durch die die Fremd-DNA in das Zytoplasma gelangen kann (NEUMANN et al. 1982; CHU et al. 1987; SHIGEKAWA u. DOWER 1988). Bei dieser Methode ist allerdings der Anteil toter Zellen sehr hoch (>50%).

Bei der Mikroinjektion wird mit einer feinen Kapillarnadel die DNA direkt in den Zellkern der behandelten Zelle injiziert. Diese sehr aufwendige Methode eignet sich jedoch nur für die Transfektion weniger Zellen (CAPECCHI 1980).

Bei einer weiteren Möglichkeit der Genübertragung wird die negativ geladene DNA zunächst *ex vivo* mit kationischen Lipiden inkubiert, wobei sich aufgrund der entgegengesetzten Ladungen ein DNA-Lipid-Komplex herausbildet (FELGNER u. RINGOLD 1989; KNECHTLE et al. 1996; ABUL-HASSAN et al. 2000). Nach Adsorption des gebildeten DNA-Lipid-Komplexes an die Zelloberfläche und nach dessen Einschleusung in die Zelle mittels Endozytose oder Membranfusion kann

das Gen nach Erreichen des Zellkernes in entsprechendes Protein umgeschrieben werden (LEDLEY 1994; KNECHTLE et al. 1996; GROTH et al. 1998). Toxische Effekte von kationischen Lipid-DNA-Komplexen auf den Organismus (*in vivo*) wurden nicht beobachtet (LEDLEY 1994).

Die aktivierten Dendrimere ähneln in ihrer Wirkungsweise den kationischen Lipiden: sie bestehen aus positiv geladenen Aminogruppen, an die sich die DNA anlagern kann. Der so entstandene Dendrimer-DNA-Komplex wird von der Zelle über Endozytose aufgenommen (HAENSLER u. SZOKA 1993; TANG et al. 1996; GEBHART u. KABANOV 2001). Bei diesen Polykationen wurden weder *in vitro* (KABANOV 1999; URTTI et al. 2000) noch *in vivo* (ABDALLAH et al. 1996; KABANOV 1999; GOULA et al. 2000) toxische Effekte beobachtet.

Aktivierte Dendrimere und kationische Lipide sind leicht anwendbar und wurden bei unseren Arbeiten verwendet.

Gegenwärtig sind verschiedene kationische Transfektionsreagenzien im Handel erhältlich. Für das Erreichen einer optimalen Transfektionseffizienz bei hRPE-Zellen wurden in dieser Arbeit sowohl verschiedene kationische Lipide und aktivierte Dendrimere als auch verschiedene hRPE-Zelllinien ausgetestet und gegenübergestellt.

Verglichen wurden untereinander die Transfektionsreagenzien SuperFect™ (aktivierte Dendrimere), Effectene™ (kationische Lipide) und FuGENE™6 (kationische Lipide). Während bereits bei Konzentrationen von 25 µl Super-Fect™ beziehungsweise 30 µl Effectene™ zytotoxische Effekte beobachtet werden konnten, trat diese Nebenwirkung bei FuGENE™6 auch in höheren Konzentrationen nicht auf. Die maximal erreichte Transfektionseffizienz mit SuperFect™ lag bei 5,6 %, mit Effectene™ bei 3,4 % und mit FuGENE™6 bei 18,9 %. Für die durchgeführten Versuche verwendeten wir deshalb FuGENE™6.

HOLLBORN et al. (2000 b) untersuchten die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Alter der hRPE-Zell-Spender. Sie konnten feststellen, dass mit zunehmendem Spenderalter die Transfektionseffizienz sank. Aufgrund dieser Beo-

bachtung verwendeten wir RPE-Zellen junger Spender (Alter: 16 beziehungsweise 21 Jahre).

Diesen Zellen stellten wir eine mit dem Gen für das Enzym Telomerase-Reverse-Transkriptase transfizierte, immortalisierte Permanent-Zelllinie (hTERT-RPE1-Zellen) gegenüber. Körperzellen verlieren normalerweise einen kleinen DNA-Abschnitt nach jeder Zellteilung aufgrund der Unfähigkeit der DNA-Polymerase, Chromosomenenden (Telomere) vollständig zu replizieren (HARLEY 1991). Diese Telomere stellen „Schutzhüllen“ für die Enden der Chromosomen dar und schützen diese vor Aberrationen (BLACKBURN u. SZOSTAK 1984; ZAKAIN 1989; BLACKBURN 1991; FENG et al. 1995). Die Telomere verkürzen sich progressiv, bis sie eine Mindestlänge unterschreiten. Die dadurch gealterten Zellen bleiben danach zwar lebensfähig, können sich aber nicht weiter teilen (HARLEY 1991; KIM et al. 1994; WRIGHT u. SHAY 1995). Das Enzym Telomerase-Reverse-Transkriptase, ein Ribonukleoprotein, synthetisiert die spezifischen Telomerasequenzen an die Chromosomenenden, so dass die Telomerenlänge konstant gehalten wird (LINGNER et al. 1997). Die Telomerase ist aktiv in Keimzellen und bei nahezu allen Tumorzellen, jedoch nicht in den meisten somatischen Zellen (KIM et al. 1994; FENG et al. 1995; BODNAR et al. 1998).

Die immortalisierte humane RPE-Permanent-Zelllinie (hTERT-RPE1-Zellen) synthetisiert wie normale mortale hRPE-Zellen kein IL-10 (HOLLBORN et al. 2000) und zeigt auch biochemisch dieselben Charakteristika. Außerdem ist sie ebenfalls zytokeratinpositiv (RAMBHATLA et al. 1999); dies konnten wir mithilfe der Immunhistochemie bestätigen. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Teilungsrate über mehrere Populationsdopplungen (PD) hinweg konstant blieb.

Die hTERT-RPE1-Zellen wiesen eine Transfektionseffizienz von  $23,3 \pm 9,0$  % auf. Die erzielte Effizienz war damit etwa doppelt so hoch im Vergleich zu den Spender-hRPE-Zellen ( $10,3 \pm 4,5$  %). Aufgrund dieser Tatsache verwendeten wir für unsere Versuche die immortalisierten hTERT-RPE1-Zellen, verglichen die Ergebnisse jedes einzelnen Experimentes jedoch trotzdem mit Zellen der Spender-hRPE-Zelllinien. Dieser durchgeführte Vergleich legt den Schluss nahe, die immortalisierten und effizienter transfizierbaren hTERT-RPE1-Zellen in eine

später folgende klinische Testung einzubeziehen. Ethische Gesichtspunkte und die mögliche Gefahr der tumorösen Entartung der immortalisierten Zellen sprechen allerdings gegen eine Anwendung der hTERT-RPE1-Zellen am Patienten.

Wir konnten außerdem zeigen, dass die Transfektion mit kationischen Lipiden keinen Einfluss auf die Apoptose und auf die Vitalität der hRPE-Zellen hat. Somit besitzt sie keine zytotoxische Nebenwirkung und ist *in vivo* anwendbar.

Der erste Schritt dieser Arbeit galt der Konstruktion eines geeigneten Vektors für das IL-10-Gen. Wie bereits unter Kapitel 4.1 beschrieben, wurde dafür IL-10-DNA in ein Plasmid übertragen. Plasmide sind in Bakterien extrachromosomal gelegene ringförmige DNA-Moleküle, die neben dem eingebauten therapeutischen Gen Antibiotikaresistenzgene und einen Promotor, in unserem Fall derjenige des Zytomegalievirus (CMV), der die Transkription in Säugerzellen ermöglicht, enthalten. Zusätzlich kodiert es auch für einen Replikationsursprung zur autonomen Vermehrung in Bakterien. Es ist den Bakterien daher möglich, die im Plasmid befindliche Information unabhängig vom Bakteriengenom zu replizieren. Kommerziell erworbene *E.coli*-Bakterien wurden mit diesem konstruierten Plasmid transformiert und vermehrt. Aufgrund des plasmid-kodierten Ampicillin-Resistenzgens konnten auf mit Ampicillin behandelten LB-Platten erfolgreich transformierte Bakterien selektiert werden.

Im Anschluss daran wurden hRPE-Zellen mit diesem Plasmid (pCIneoIL-10) transfiziert und die IL-10-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht.

Der Nachweis der mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR erbracht. Der Vergleich mit untransfizierten und mit verschiedenen Plasmiden (pCIneoLacZ, pCIneo) transfizierten hRPE-Zellen als Kontrollen bewies, dass die Zellen lediglich nach Transfer von pCIneoIL-10 IL-10-mRNA exprimierten.

Das von den transfizierten hRPE-Zellen sezernierte IL-10-Protein wurde mittels ELISA untersucht. Die höchste gemessene IL-10-Protein-Konzentration lag bei den hTERT-RPE1-Zellen bei  $10,3 \pm 0,8$  ng/ml, bei den Spender-hRPE-Zellen bei



3,1 ng/ml. Die Konzentrationsmaxima lagen bei beiden Zelllinien am Tag 3. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von SHINOZAKI et al. (1999). Das IL-10-Konzentrationsmaximum der transfizierten Zellen lag bei dieser Forschungsgruppe ebenfalls am Tag 3 mit einem gemessenen Wert von 60 ng/ml. Diese IL-10-Konzentration, die unseren gemessenen Wert um ein Vielfaches übersteigt, hängt mit der verwendeten Gentransfer-Methode (Adenoviren) zusammen. Als Kontrolle dienten Überstände von hRPE-Zellen, die mit dem Gen für IL-10 in antisense-Orientierung transfiziert wurden (gemessene Menge: 0 ng/ml). Durch das eingebaute IL-10-Gen in falscher Orientierung erfolgt die Transkription einer anderen Gensequenz. Das entstehende Protein hat demzufolge keine Ähnlichkeit mit IL-10 und kann im IL-10-spezifischen ELISA nicht erfasst werden.

Vor der Untersuchung der Wirkung des von den hRPE-Zellen sezernierten IL-10 auf die T-Lymphozytenproliferation wurde die Expression der MHC Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche von hRPE-Zellen nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  gemessen. MHC-Antigene der Klasse II sind aufgrund ihrer Fähigkeit, fremde Antigene immunkompetenten Zellen wie T-Lymphozyten zu präsentieren, entscheidend für die Auslösung einer Immunantwort. Daher werden sie als Initiatoren der Transplantat-Abstoßungsreaktion betrachtet (SINGER u. BACH 1995).

Das Immunprivileg des Subretinalraumes stellt sich als relativ und nicht absolut dar (JIANG u. STREILEIN 1990/1991, 1992; JIANG et al. 1993). ALGVERE et al. (1994, 1997) bewiesen diese Aussage anhand von Versuchen, in denen transplantierte fetale humane RPE-Zellen trotz des privilegierten Status nach 3 Monaten (exsudative AMD) beziehungsweise nach 6 bis 20 Monaten (trockene AMD) im Patienten abgestoßen wurden. Bei der Übertragung von gesunden RPE-Zellen in das Gebiet der Macula lutea bei der Altersabhängigen Makuladegeneration bietet somit dieses eingeschränkte Immunprivileg keine Garantie für das Überleben des Transplantates. *In vitro*-Studien belegen, dass RPE-Zellen in der Lage sind, MHC Klasse II-Antigene auf ihrer Oberfläche vermehrt zu exprimieren und folglich als lokale APC im Auge fungieren (LIVERSIDGE u. FORRESTER 1992). Im Rahmen einer allogenen Transplantation ist diese Tatsache von Nachteil. Ziel muss also sein, die MHC Klasse II-Expression zu vermindern, um folglich ein Aktivieren der

T-Lymphozyten durch Erkennen dieser MHC-Antigene und damit die Zerstörung des Transplantates zu verhindern.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit sowohl hTERT-RPE1-Zellen als auch Spender-hRPE-Zellen über einen definierten Zeitraum mit IFN- $\gamma$  stimuliert und die veränderte MHC Klasse II-Expression mittels FACS-Analyse untersucht. Bei den Spender-hRPE-Zellen wurden höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen eingesetzt, da bei 50 U/ml keine signifikante Wirkung nachweisbar war.

Unsere Ergebnisse zeigen bei beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Expression der MHC Klasse II-Moleküle und bestätigen somit die Ergebnisse von ENZMANN et al. (1999 b). Die bei uns gemessene maximale Expression von  $86,1 \pm 2,5$  % (hTERT-RPE1-Zellen) beziehungsweise  $91,0 \pm 6,0$  % (Spender-hRPE-Zellen) bestätigte die Ergebnisse von LIVERSIDGE et al. (1988 b) und von ZAVAZAVA et al. (1991). Außerdem konnte bei den Spender-hRPE-Zellen beobachtet werden, dass mit zunehmender Inkubationsdauer der Zellen mit IFN- $\gamma$  die MHC Klasse II-Expression anstieg. Dies stimmt mit den Beobachtungen von ENZMANN et al. (1999 b) bei bovinen RPE-Zellen überein.

Bei den hTERT-RPE1-Zellen hingegen nahm die Expressionsrate mit zunehmender Versuchsdauer ab. Es erscheint möglich, dass sich durch den Vorgang der Telomerase-Immortalisierung die MHC Klasse II-Expression der hTERT-RPE1-Zellen anders verhält als bei den nicht immortalisierten Spender-hRPE-Zellen.

Weiterhin wurde untersucht, ob humane RPE-Zellen in der Lage sind, konstitutiv MHC Klasse II-Moleküle zu exprimieren. Hierfür wurden unstimulierte hRPE-Zellen ebenfalls mittels FACS-Analyse untersucht. Wir konnten zeigen, dass sowohl die hTERT-RPE1-Zellen (zwischen  $0,6 \pm 0,4$  % und  $0,9 \pm 0,9$  %) als auch die Spender-hRPE-Zellen (zwischen  $6,0 \pm 0,3$  % und  $8,6 \pm 3,7$  %) MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. ENZMANN et al. (1998 b, 1999 b) wiesen nach, dass bovine RPE-Zellen mit Werten von etwa 10 % MHC Klasse II-positiv sind. KOHEN et al. (1997) zeigten, dass RPE-Zellen aus Kaninchen mit einem prozentualen Anteil von  $11,38 \pm 0,94$  % ebenfalls diese Antigene exprimieren.

1999 konnte von ENZMANN und Mitarbeitern (1999 b) nachgewiesen werden, dass durch IL-10 *in vitro* die MHC Klasse II-Expression signifikant supprimiert werden kann. Dafür wurden bovine RPE-Zellen mit IFN- $\gamma$  stimuliert, danach mit IL-10 inkubiert und die Anzahl MHC Klasse II-positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung ermittelt.

Zur Untersuchung der Effekte des von den Zellen sezernierten IL-10-Proteins wurden in einem nächsten Schritt humane RPE-Zellen mit dem Gen für IL-10 transfiziert und zusammen mit allogeenen T-Lymphozyten beziehungsweise T-Lymphozyten plus Makrophagen (professionelle APC) inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten die T-Lymphozytenproliferation gemessen. Grundlage für unsere Proliferationsversuche war eine *mixed lymphocyte-epithelial cell reaction* (MLECR). Dies ist ein *in vitro*-Modell, das die Kompatibilität zwischen zwei verschiedenen Individuen, wie es auch bei der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) (MALINOWSKI et al. 1992; LECHLER et al. 1995) vor einer Transplantation bestimmt wird, misst. In unserem Modell wurden die hRPE-Zellen des potentiellen Spenders mit Mitomycin C behandelt, so dass diese zwar ihre Antigene präsentierten, sich aber nicht weiter teilen konnten. Zu diesem Ansatz wurden humane T-Lymphozyten mit beziehungsweise ohne Makrophagen des fremden Empfängers gegeben und die T-Lymphozytenproliferation bestimmt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch Transfektion der humanen RPE-Zellen mit dem Gen für IL-10 und dessen Sekretion die Proliferation der T-Lymphozyten signifikant supprimiert werden kann. Dabei spielte es keine Rolle, ob die hRPE-Zellen vor Versuchsbeginn mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurden oder nicht.

Das Ausmaß der signifikanten Suppression der T-Zellproliferation lag je nach Art der eingesetzten Zelllinie, nach Versuchsdauer und je nach Kokultivierung mit oder ohne Makrophagen zwischen  $14,1 \pm 1,1$  % (hTERT-RPE1-Zellen; 6 Tage) und  $71,4 \pm 6,4$  % (Spender-hRPE-Zellen; 3 Tage) der Kontrolle.

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Suppression der T-Zellproliferation durch IL-10 als immunsuppressives Agens auf zwei Wegen. Der direkte Weg ist charakterisiert durch eine Verminderung der IL-2- (DEWAAL MALEFYT et al. 1993; DEVRIES 1995) und IFN- $\gamma$ -Synthese (DELPRETE et al. 1993) der T-Lymphozyten. Eine

dadurch hervorgerufene Verminderung der MCH Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche der Makrophagen kennzeichnet den indirekten Weg und führt zu einer stark reduzierten antigenpräsentierenden Kapazität dieser APC. Dadurch wird eine optimale antigenspezifische proliferative T-Zellantwort reduziert oder verhindert (DEWAAL MALEFYT et al. 1991 a, b). Die Verhinderung der Synthese von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  als kostimulierende Faktoren, die auf die T-Zellproliferation positiv wirken, ist ein weiterer Grund für die Suppression der T-Lymphozytenproliferation (DING u. SHEVACH 1992).

Wir konnten zeigen, dass die Suppression der T-Zellproliferation sowohl auf direktem (T-Lymphozyten) als auch auf indirektem (T-Lymphozyten plus Makrophagen) Weg erfolgt. Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von TAGA und Mitarbeitern (1993) überein, die den Nachweis erbrachten, dass IL-10 das T-Zellwachstum ohne Anwesenheit von Makrophagen direkt hemmen kann. Die Forschungsgruppen DEWAAL MALEFYT et al. (1991 b), BEJARANO et al. (1992) und DING und SHEVACH (1992) dagegen führten Versuche unter Anwesenheit von professionellen APC durch. Sie konnten nachweisen, dass eine Suppression der T-Lymphozytenproliferation auch indirekt möglich ist und bestätigen damit ebenfalls unsere Ergebnisse. Die Versuche mit den Spender-hRPE-Zellen konnten nur eingeschränkt durchgeführt werden. Probleme bei der Zellkultivierung und die limitierte Verfügbarkeit von humanen Spenderzellen zwangen uns, die Versuchsdauer auf zwei bis vier Tage zu beschränken (bei hTERT-RPE1-Zellen: zwei bis sechs Tage). Außerdem stellten wir fest, dass der Proliferationsassay lediglich unter Anwesenheit von Makrophagen als professionelle APC auswertbare Ergebnisse brachte. Sehr wahrscheinlich ist, dass Makrophagen Faktoren synthetisieren, die mitogen auf das RPE-Zellwachstum wirken (KIRCHHOF et al. 1989) und sich somit als unentbehrlich für die durchgeführten Experimente erwiesen.

Eine signifikante Abnahme der T-Lymphozytenproliferation trat verzögert auf, das heißt, bei den hTERT-RPE1-Zellen am Tag 6 (mit T-Lymphozyten) beziehungsweise am Tag 5 und Tag 6 (T-Lymphozyten plus Makrophagen) und bei den Spender-hRPE-Zellen am Tag 3 und Tag 4 (T-Lymphozyten plus Makrophagen). Grundlage dafür ist das Maximum der IL-10-Synthese am Tag 3 mit Konzentrationen von  $10,3 \pm 0,8$  ng/ml (hTERT-RPE1-Zellen) beziehungsweise 3,1 ng/ml

(Spender-hRPE-Zellen). Dies könnte mithilfe der Beobachtungen von YSSEL et al. (1992) erklärt werden. Diese Forschungsgruppe stimulierte T-Lymphozyten und untersuchte die Kinetik des synthetisierten IL-10. Es wurde beobachtet, dass die maximale IL-10-Proteinsynthese zwischen 24 und 48 Stunden liegt und damit relativ spät auftritt. Diese späte Synthese von IL-10 könnte mit der These übereinstimmen, dass IL-10 als natürlicher Suppressor von Immunantworten dient (DEVRIES 1995).

Die Verminderung der T-Zellproliferation konnte unter Verwendung von Anti-IL-10-Antikörpern bei unseren Experimenten *in vitro* komplett aufgehoben werden. Damit wurde bewiesen, dass die hervorgerufene Suppression ausschließlich auf die Wirkung des von den hRPE-Zellen sezernierten IL-10 zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es möglich ist, humane retinale Pigmentepithelzellen mit dem Gen für das Zytokin IL-10 *in vitro* zu transfizieren und damit eine Suppression einer allogenen T-Lymphozytenstimulierung durch die folgende IL-10-Sekretion hervorzurufen.

Vor einer Anwendung im klinischen Bereich müssten diese Resultate allerdings in tierexperimentellen Studien (*in vivo*) bestätigt werden. Unter Zuhilfenahme eines Tiermodells könnten *ex vivo* transfizierte hRPE-Zellen vorzugsweise jüngerer Spender transplantiert werden und die Transplantattoleranz über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

## **5.1 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Probleme der hRPE-Zell-Transplantation diskutiert. Davon ausgehend sind im nachfolgenden Abschnitt eine Reihe von Lösungsansätzen aufgelistet.

Eine Verbesserung der lokalen und systemischen Immunsuppression beispielsweise würde die Nebenwirkungen und somit das Risiko für den Patienten einschränken.

Tatsache ist, dass jüngere Spenderzellen im Vergleich zu älteren Spenderzellen eine größere Proliferationsrate besitzen und sich effizienter transfizieren lassen. Deshalb schränkt sich der ohnehin schon kleine Kreis der Spender noch weiter ein. Eine Möglichkeit, dem Mangel an Spenderzellen entgegenzuwirken, bietet die xenogene Transplantation von Zellen (meist Schwein). Die Problematik ist hier die hyperakute Abstoßung, so dass diese Methode vor einem Einsatz in der Praxis weiterentwickelt werden muss.

Die Stammzellforschung befasst sich mit embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen, die imstande sind, sich zu einem spezialisierten Zelltyp zu entwickeln. Die sogenannten adulten Stammzellen können aus dem Patienten selbst entnommen werden und rufen deshalb später keine Abstoßungsreaktion hervor. Eine Verwirklichung dieses Ziels bedarf allerdings noch weiterer Forschung.

## 6 Zusammenfassung

### **Poschinger, Katharina:**

Untersuchungen zur Expression von Interleukin-10 nach Transfektion humaner retinaler Pigmentepithelzellen und dessen Einfluss auf die Proliferation von T-Lymphozyten *in vitro*.

Leipzig; Institut für Virologie (Veterinärmedizinische Fakultät) und Augenklinik (Medizinische Fakultät) der Universität Leipzig, 2002

97 Seiten, 12 Abbildungen, 13 Tabellen, 186 Literaturangaben

Bei der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) handelt es sich um eine Erkrankung des Auges, die die Macula lutea, die Stelle des schärfsten Sehens betrifft. Sie ist verbunden mit der Degeneration von RPE-Zellen, die zur Dystrophie von Photorezeptoren und damit zum Verlust des zentralen Sehvermögens führt. Eine ähnliche Pathophysiologie ist bei der sogenannten Retinalen Pigmentepitheldystrophie (RPED) des Hundes zu beobachten.

Die Transplantation von gesunden RPE-Zellen in das betroffene Gebiet stellt eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar. Die Transplantatabstoßung als Komplikation schränkt die klinische Anwendung ein. Eine beim Patienten nach Transplantation lebenslang durchgeführte systemische Immunsuppression ist mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Deshalb bietet die Gentherapie unter Einbezug immunsuppressiver Zytokine wie beispielsweise des Interleukin-10 (IL-10) eine Lösung.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein selbst konstruierter IL-10-Expressionsvektor (Plasmid pCIneoIL-10) mittels Gentransfer in humane RPE-Zellen *in vitro* eingebracht. Untersucht wurde die Wirkung des sezernierten IL-10 auf die Proliferation von allogenen T-Lymphozyten mit und ohne allogene Makrophagen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC).

Neben humanen Spender RPE-Zellen (Spender-hRPE-Zellen) wurde eine immortalisierte Permanent-Zelllinie (hTERT-RPE1-Zellen) eingesetzt, deren Hauptvorteil in einer gleichbleibend hohen Wachstumsrate lag. Als transientes Transfektionssystem für den Transfer von IL-10-DNA in hRPE-Zellen wurden kationische Lipide gewählt. Drei verschiedene Lipidformulierungen wurden miteinander verglichen und das optimale Transfektionsreagenz:DNA-Verhältnis, mit dem die höchste

Transfektionseffizienz erreicht werden konnte, evaluiert. Eine Transfektionseffizienz von  $23,3 \pm 9,0$  % (hTERT-RPE1-Zellen) beziehungsweise  $10,3 \pm 4,5$  % (Spender-hRPE-Zellen) konnte erreicht werden. Die Transfektion hatte weder einen negativen Einfluss auf die Vitalität der hRPE-Zellen, noch wurde der natürliche Zelltod, die Apoptose, erhöht. Die IL-10-mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Lediglich bei den transfizierten hRPE-Zellen konnte IL-10-mRNA gefunden werden. Mittels ELISA konnte das IL-10-Protein gemessen werden. Die Sekretion des IL-10 in den Kulturüberstand von transfizierten hRPE-Zellen wurde dafür über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die maximale IL-10-Proteinkonzentration bei beiden Zelllinien am Tag 3 mit Werten von  $10,3 \pm 0,8$  ng/ml (hTERT-RPE1-Zellen) und 3,1 ng/ml (Spender-hRPE-Zellen) lag. Es bestand überdies eine positive Korrelation zwischen Transfektionseffizienz und synthetisiertem IL-10. Es wurde außerdem gezeigt, dass durch Stimulation mit dem immunmodulatorischen Zytokin Interferon-gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) hRPE-Zellen MHC Klasse II-Moleküle vermehrt exprimierten. Damit sind sie ebenso wie die Makrophagen zur Antigenpräsentation fähig.

Die Wirkung des von den transfizierten hRPE-Zellen sezernierten IL-10 auf die Proliferation von T-Lymphozyten wurde zwischen Tag 2 und Tag 6 (hTERT-RPE1-Zellen) beziehungsweise zwischen Tag 2 und Tag 4 (Spender-hRPE-Zellen) photometrisch untersucht. Die Proliferation allogener T-Lymphozyten mit beziehungsweise ohne Makrophagen konnte durch das sezernierte IL-10 supprimiert werden. Bei den hTERT-RPE1-Zellen lag ohne die Anwesenheit von professionellen APC am Tag 6 eine signifikante Reduktion der T-Lymphozytenproliferation vor, während bei Kokultivierung mit Makrophagen Signifikanzen am Tag 5 und Tag 6 erkennbar waren. Die immunsuppressive Wirkung von IL-10 konnte mittels Anti-IL-10-Antikörper neutralisiert werden. Damit wurde bewiesen, dass die proliferations-supprimierende Wirkung auf IL-10 zurückzuführen war.

Diese Ergebnisse könnten demnach neue Möglichkeiten zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion nach RPE-Zelltransplantation bei Patienten mit AMD eröffnen.



## 7 Summary

### **Poschinger, Katharina:**

Investigations on the expression of interleukin-10 after transfection of human retinal pigment epithelial cells and its influence on the proliferation of T lymphocytes *in vitro*.

Leipzig; Institute for Virology (Faculty of Veterinary Medicine) and Institute of Ophthalmology (Faculty of Medicine), University of Leipzig, Germany, 2002

97 pages, 12 figures, 13 tables, 186 references

Age-related macular degeneration (AMD) is a disease of eyes affecting the macula lutea, the area of the retina with the highest density of retinal pigment epithelial cells (RPE cells). The disease is characterized by degeneration of RPE cells resulting in dystrophy of photoreceptors and finally loss of central vision. Transplantation of healthy RPE cells is a promising possibility for therapy but rejection of the allotransplant limits clinical application. One way to avoid this complications is a systemic immunosuppression of the recipient but this is combined with many side effects.

In this thesis a self-constructed IL-10 expression vector (plasmid pCIneoIL-10) has been transferred into human RPE cells *in vitro* by gene transfer.

In addition to human donor RPE cells a permanent RPE cell line (hTERT-RPE1 cells) was employed. Kationic lipids were used as transient transfection system for transfer of pCIneoIL-10 into hRPE cells. Three different lipid formulations and various ratios of transfection reagent:DNA were evaluated for highest transfection efficacy. With the optimized protocols a transfection efficacy of  $23,3 \pm 9,0 \%$  (hTERT-RPE1 cells) and  $10,3 \pm 4,5 \%$  (donor hRPE cells) was achieved. A negative influence on the viability of the hRPE cells after transfection was not observed. The IL-10 mRNA expression was analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Only in transfected hRPE cells the IL-10 mRNA-amplicon with 383 bp in size was found. Secretion of IL-10 protein in the cell culture supernatants of transfected hRPE cells was investigated using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) daily for 7 days. The IL-10 protein concentrations peaked at day 3 with  $10,3 \pm 0,8 \text{ ng/ml}$  (hTERT-RPE1 cells) and  $3,1$

ng/ml (donor hRPE cells). The amount of secreted IL-10 positively correlated with transfection efficacy.

After stimulation with the immunomodulatory cytokine interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) the expression of MHC class II molecules on hRPE cells is increasing. Therefore they are able to present antigens similar to macrophages.

Hence, the effects of recombinantly expressed IL-10 on the proliferation of allogeneic T lymphocytes were investigated both with and without allogeneic macrophages as professional antigen presenting cells (APC).

Proliferation of T lymphocytes has been investigated colorimetrically between day 2 and day 6 (hTERT-RPE1 cells) and day 2 and day 4 (donor hRPE cells) respectively. The proliferation of allogeneic T lymphocytes with and without macrophages could be suppressed by the secreted IL-10. Significant reduction of proliferation was observed at day 6 in absence of professional APC ( $14,1 \pm 1,1$  % to 100% of untransfected control) and between day 5 ( $44,1 \pm 4,9$  %) and day 6 ( $37,4 \pm 6,3$ %) in the presence of macrophages. It was possible to neutralize the immunosuppressive effect of IL-10 with anti-IL-10 antibodies. Proving that the suppressive effect of T lymphocyte proliferation was caused by IL-10.

Thus, the specific IL-10 gene transfer into hRPE cells prior to transplantation may prevent rejection process and could prove a reliable method to help prevent loss of central vision due to AMD.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABDALLAH, B., A. HASSAN, C. BENOIST, D. GOULA, J. P. BEHR u. B. A. DEMENEIX (1996):** A powerful nonviral vector for *in vivo* gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum. Gene Ther.* 7, 1947 - 1954
- ABUL-HASSAN, K., R. WALMSLEY u. M. BOULTON (2000):** Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 20, 361 - 366
- ALGVERE, P. V., L. BERGLIN, P. GOURAS u. Y. SHENG (1994):** Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 232, 707 - 716
- ALGVERE, P. V., L. BERGLIN, P. GOURAS, Y. SHENG u. E. DAFGARD KOPP (1997):** Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 235, 149 - 158
- ALGVERE, P. V., P. GOURAS u. E. DAFGARD KOPP (1999):** Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur. J. Ophthalmol.* 9, 217 - 230
- ALTMAN, J. (1994):** Microglia emerge from the fog. *Trends Neurosci.* 17, 47 - 49
- AMENTO, E. P., u. L. S. BECK (1991):** TGF- $\beta$  and wound healing.  
in: *Clinical applications of TGF- $\beta$* . Wiley, Chichester (*Ciba Foundation Symposium 157*), S. 115 - 129
- BARKER, C. F. , u. R. E. BILLINGHAM (1977):** Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25, 1 - 54
- BARRON, K. D. (1995):** The microglial cell. A historical review. *J. Neurolog. Sci.* 134, 57 - 68
- BAUDOUIN, C., D. FREDJ-REYGROBELLET, D. JAMBOU, P. GASTAUD u. P. LAPALUS (1990) :** HLA DR and DQ expression on human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 228, 86 - 89
- BEJARANO, M.-T., R. DEWAAL MALEFYT, J. S. ABRAMS, M. BIGLER, R. BACCHETTA, J. E. DEVRIES u. M.-G. RONCAROLO (1992):** Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int. Immunol.* 4, 1389 - 1397
- BELIN, M. W., C. S. BOUCHARD u. T. M. PHILLIPS (1990):** Update on topical cyclosporin A. *Cornea* 9, 184 - 195
- BENSON, M. T., L. SHEPHERD, R. C. REES u. I. G. RENNIE (1992):** Production of interleukin-6 by human retinal pigment epithelium *in vitro* and its regulation by other cytokines. *Curr. Eye Res.* 11, 173 - 179
- BERGER, A. S., u. H. J. KAPLAN (1992):** Clinical experience with the surgical removal of subfoveal neovascular membranes. *Ophthalmology* 99, 969 - 976
- BERGLIN, L., P. GOURAS, Y. SHENG, J. LAVID, P.-K. LIN, H. CAO u. H. KJELDBYE (1997):** Tolerance of human fetal retinal pigment epithelium xenografts in monkey retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 235, 103 - 110

**BLACKBURN, E. H. (1991):** Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569 - 573

**BLACKBURN, E. H., u. J. W. SZOSTAK (1984):** The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 163 - 194

**BLINDER, K. J., G. A. PEYMAN, C. L. PARIS u. C. M. GREMILLION (1991):** Submacular scar excision in age-related macular degeneration. *Int. Ophthalmol.* 15, 215 - 222

**BLUESTONE, J. A., u. R. I. LECHLER (1995):** Transplantation: editorial overview. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 617 - 619

**BODNAR, A. G., M. OUELLETTE, M. FROLKIS, S. E. HOLT, C.-P. CHIU, G. B. MORIN, C. B. HARLEY, J. W. SHAY, S. LICHTSTEINER u. W. E. WRIGHT (1998):** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349 - 352

**BOK, D. (1985):** Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 1659 - 1694

**BOROS, P. S., T. SUEHIRO, S. CURTISS, P. SHEINER, S. EMRE, S. GUY, M. E. SCHWARTZ u. C. M. MILLER (1997):** Differential contribution of graft and recipient to perioperative TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 levels and correlation with early graft function in clinical liver transplantation. *Clin. Transplantation* 11, 588 - 592

**BOORSTEIN, S. M., S. G. ELNER, Z. M. BIAN, R. M. STRIETER, S. L. KUNKEL u. V. M. ELNER (1997):** Selective IL-10 inhibition of HLA-DR expression in IFN- $\gamma$ -stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 16, 547 - 555

**BRESSLER, N. M., S. B. BRESSLER u. E. S. GRAGOUDAS (1987):** Clinical characteristics of choroidal neovascular membranes. *Arch. Ophthalmol.* 105, 209 - 213

**BRESSLER, N. M., S. B. BRESSLER u. S. L. FINE (1988 a):** Age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 32, 375 - 413

**BRESSLER, N. M., L. A. FROST, S. B. BRESSLER, R. P. MURPHY u. S. L. FINE (1988 b):** Natural course of poorly defined choroidal neovascularization associated with macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 106, 1537 - 1542

**BROMBERG, J. S. (1995):** IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 639 - 643

**CAMPOCHIARO, P. A. (1993):** Cytokine production by retinal pigmented epithelial cells. *Int. Rev. Cytol.* 146, 75 - 82

**CAPECCHI, M. (1980):** High efficiency transformation by direct microinjection into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479 - 488

**CASELLA, A. M., K. E. TABA, H. KIMURA, C. SPEE, J. A. CARDILLO, S. J. RYAN u. D. R. HINTON (1999):** Retinal pigment epithelial cells are heterogeneous in their expression of MHC-II after stimulation with interferon- $\gamma$ . *Exp. Eye Res.* 68, 423 - 430

**CHU, G., H. HAYAKAWA u. P. BERG (1987):** Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl. Acids Res.* 15, 1311 - 1325

**CLARK, D. A., u. R. COKER (1998):** Molecules in focus: Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 293 - 298

**COLLART, MA, P. BAEUERLE u. P. VASALLI (1990):** Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* 10, 1498 - 1506

**COLLINS, T., M. A. READ, A. S. NEISH, M. Z. WHITLEY, D. THANOS u. T. MANIATIS (1995):** Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9, 899 - 909

**CONNER, T. B., A. B. ROBERTS, M. B. SPORN, D. DANIELPOUR, L. L. DART, R. G. MICHELS, S. DEBUSTROS, C. ENGER, H. KATO, M. LANSING, H. HAYASHI u. B. M. GLASER (1989):** Correlation of fibrosis and transforming growth factor- $\beta$  type 2 levels in the eye. *J. Clin. Invest.* 83, 1661 - 1666

**COUSINS, S. W., M. M. MCCABE, D. DANIELPOUR u. J. W. STREILEIN (1991):** Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 2201 - 2211

**CRAFOORD, S., P. V. ALGVERE, S. SEREGARD u. E. DAFGARD KOPP (1999):** Long-term outcome of RPE allografts to the subretinal space of rabbits. *Acta Ophthalmol. Scand.* 77, 247 - 254

**CRYSTAL, R. G. (1995):** Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270, 404 - 410

**CZARNIECKI, C. W., H. H. CHIU, G. H. WONG, S. M. MCCABE u. M. A. PALLADINO (1988):** Transforming growth factor- $\beta_1$  modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J. Immunol.* 140, 4217 - 4223

**DEBRUYNE, L. A., K. LI, L. QIN, D. K. BISHOP u. J. S. BROMBERG (1998):** Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses. *Gene Therapy* 5, 1079 - 1087

**DEJUAN, E., u. R. MACHEMER (1988):** Vitreous surgery for hemorrhagic and fibrous complications of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 105, 25 - 29

**DELPRETE, G., M. DECARLI, F. ALMERIGOGNA, M. G. GIUDIZI, R. BIAGIOTTI u. S. ROMAGNANI (1993):** Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cells clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150, 353 - 360

**DETRICK, B., D. A. NEWSOME, C. M. PERCOPO u. J. J. HOOKS (1985):** Class II antigen expression and gamma interferon modulation of monocytes and retinal pigment epithelial cells from patients with retinitis pigmentosa. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 36, 201 - 211

**DETRICK, B., M. RODRIGUES, C.-C. CHAN, M. O. TSO u. J. J. HOOKS (1986):** Expression of HLA-DR antigen on retinal pigment epithelial cells in retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* 101, 584 - 590

**DEVRIES, J. E. (1995):** Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann. Med.* 27, 537 - 541

**DEWAAL MALEFYT, R., J. ABRAMS, B. BENNETT, C. G. FIGDOR u. J. E. DEVRIES (1991 a):** Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209 - 1220

**DEWAAL MALEFYT, R., J. HAANEN, H. SPITS, M.-G. RONCAROLO, A. TEVELDE, C. FIGDOR, K. JOHNSON, R. KASTELEIN, H. YSSEL u. J. E. DEVRIES (1991 b):** Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174, 915 - 924

**DEWAAL MALEFYT, R., H. YSSEL u. J. E. DEVRIES (1993):** Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and resting T cells. *J. Immunol.* 150, 4754 - 4765

**DEWAAL MALEFYT, R., H. YSSEL, M.-G. RONCAROLO, H. SPITS u. J. E. DEVRIES (1992):** Interleukin-10. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 314 - 320

**DING, L., u. E. M. SHEVACH (1992):** IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* 148, 3133 - 3139

**DIPAULO, S., L. GESUALDO, G. STALLONE, E. RANIERI u. F. P. SCHENA (1997):** Renal expression and urinary concentration of EGF and IL-6 in acutely dysfunctioning kidney transplanted patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12, 2687 - 2693

**DONATI, G., A. D. KAPETANIOS u. C. J. POURNARAS (1999):** Principles of treatment of choroidal neovascularization with photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Semin. Ophthalmol.* 14, 2 - 10

**ELNER, V. M., M. A. BURNSTINE, R. M. STRIETER, S. L. KUNKEL u. S. G. ELNER (1997):** Cell-associated human retinal pigment epithelium interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1: immunochemical and in-situ hybridization analyses. *Exp. Eye Res.* 65, 781 - 789

**ENZMANN, V., F. FAUDE, P. WIEDEMANN u. L. KOHEN (1998 a):** Immunological problems of transplantation into the subretinal space. *Acta Anat.* 162, 178 - 183

**ENZMANN, V., M. STADLER, P. WIEDEMANN u. L. KOHEN (1998 b):** In-vitro methods to decrease MHC class II-positive cells in retinal pigment epithelium cell allografts. *Ocular. Immunol. Inflamm.* 6, 145 - 153

**ENZMANN, V., A. KAUFMANN, M. HOLLBORN, P. WIEDEMANN, D. GEMSA u. L. KOHEN (1999 a):** Effective chemokines and cytokines in the rejection of human retinal pigment epithelium (RPE) cell grafts. *Transplant. Immunology* 7, 9 - 14

**ENZMANN, V., M. STADLER, P. WIEDEMANN u. L. KOHEN (1999 b):** Down-regulation of MHC class II expression on bovine retinal pigment epithelial cells by cytokines. *Ophthalmic Res.* 31, 256 - 266

**ESPEVIK, T., I. S. FIGARI, M. R. SHALABY, G. A. LACKIDES, G. D. LEWIS, H. M. SHEPARD u. M. A. PALLADINO (1987):** Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* 166, 571 - 576

**FAKTOROVICH, E. G., R. H. STEINBERG, D. YASUMURA, M. T. MATTHES u. M. M. LAVAIL (1990):** Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347, 83 - 86

**FELGNER, P. L., u. G. M. RINGOLD (1989):** Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337, 387 - 388

**FENG, J., W. D. FUNK, S.-S. WANG, S. L. WEINRICH, A. A. AVILION, C.-P. CHIU, R. R. ADAMS, E. CHANG, R. C. ALLSOPP, J. YU, S. LE, M. D. WEST, C. B. HARLEY, W. H. ANDREWS, C. W. GREIDER u. B. VILLEPONTEAU (1995):** The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236 - 1241

**FERRIS, F. L. III. (1983):** Senile macular degeneration: review of epidemiologic features. *Am. J. Epidemiol.* 118, 132 - 151

**FERRIS, F. L. III., S. L. FINE u. L. G. HYMAN (1984):** Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 102, 1640 - 1642

**FIORENTINO, D. F., M. W. BOND u. T. R. MOSMANN (1989):** Two types of mouse T helper cell: Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170, 2081 - 2095

**FIORENTINO, D. F., A. ZLOTNIK, T. R. MOSMANN, M. HOWARD u. A. O,GARRA (1991):** IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, 3815 - 3822

**GABRIELIAN, K., R. OSUSKY, B. D. SIPPY, S. J. RYAN u. D. R. HINTON (1994):** Effect of TGF- $\beta$  on Interferon- $\gamma$ -induced HLA-DR expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 4253 - 4259

**GEBHART, C. L. , u. A. V. KABANOV (2001):** Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Control. Release* 73, 401 - 416

**GOULA, D., N. BECKER, G. F. LEMKINE, P. NORMANDIE, J. RODRIGUES, S. MANTERO, G. LEVI u. B. A. DEMENEIX (2000) :** Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther.* 7, 499 - 504

**GOURAS, P., u. P. ALGVERE (1996):** Retinal cell transplantation in the macula: new techniques. *Vision Res.* 36, 4121 - 4125

**GOURAS, P., R. LOPEZ, H. KJELDBYE, B. SULLIVAN u. M. BRITTIS (1989):** Transplantation of retinal epithelium prevents photoreceptor degeneration in the RCS rat. *Prog. Clin. Biol. Res.* 314, 659 - 671

**GRAHAM, F. L., u. A. J. VANDER EB (1973):** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456 - 467

**GRIFFITH, T. S., T. BRUNNER, S. M. FLETCHER, D. R. GREEN u. T. A. FERGUSON (1995):** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189 - 1192

**GRIFFITH, T. S., u. T. A. FERGUSON (1997):** The role of Fas L-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol. Today* 18, 240 - 244

**GRISANTI, S., M. ISHIOKA, M. KOSIEWICZ u. L. Q. JIANG (1997):** Immunity and immune privilege elicited by cultured retinal pigment epithelial cell transplants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1619 - 1626

**GROTH, D., O. KEIL, C. LEHMANN, M. SCHNEIDER, M. RUDOLPH u. R. RESZKA (1998):** Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell-lines. *Int. J. Pharm.* 162, 143 - 157

**HAENSLER, J., u. F. C. SZOKA (1993):** Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 4, 372 - 379

**HANAHAN, D. (1983):** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmides. *J. Mol. Biol.* 166, 557 - 580

**HARLEY, C. B. (1991):** Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 256, 271 - 282

**HE, S., H.-M. WANG, T. E. OGDEN u. S. J. RYAN (1993):** Transplantation of cultured human retinal pigment epithelium into rabbit subretina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 231, 737 - 742

**HISCOTT, J., J. MAROIS, J. GAROUFALIS, M. D. ADDARIO, A. MOULSTON, I. KWAN, N. PEPIN, J. LACOSTE, H. NGUYEN, G. BENSIN et al. (1993):** Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promotor: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell Biol.* 13, 6231 - 6240

**HO, A. S.-Y., u. K. W. MOORE (1994):** Interleukin-10 and its receptor. *Ther. Immunol.* 1, 173 - 185

**HOLLBORN, M., V. ENZMANN, W. BARTH, P. WIEDEMANN u. L. KOHEN (2000 a):** Changes in the mRNA expression of cytokines and chemokines by stimulated RPE cells *in vitro*. *Curr. Eye Res.* 20, 488 - 495

**HOLLBORN, M., V. ENZMANN, S. RIHA, M. B. REICHEL, P. WIEDEMANN u. L. KOHEN (2000 b):** Transfection efficiency is dependent on the age of the hRPE cell donor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, S395

**HOLLYFIELD, J. G., u. P. WITKOVSKY (1974):** Pigmented retinal epithelium involvement in photoreceptor development and function. *J. Exp. Zool.* 189, 357 - 378

**HOLTKAMP, G. M., M. VANROSSEM, A. F. DEVOS, B. WILLEKENS, R. PEEK u. A. KIJLSTRA (1998):** Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 34 - 43

**HOWARD, M., u. A. O. GARRA (1992):** Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today* 13, 198 - 200

**HUDSON, H. L., D. A. FRAMBACH u. P. F. LOPEZ (1995):** Relation of the functional und structural fundus changes after submacular surgery for neovascular age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 79, 417 - 423

**HYMAN, L. G., A. M. LILIENFELD, F. L. FERRIS III. u. S. L. FINE (1983):** Senile macular degeneration: a case control study. *Am. J. Epidemiol.* 118, 213 - 227

**JIANG, L. Q., u. D. HAMASAKI (1994):** Corneal electroretinographic function rescued by normal retinal pigment epithelial grafts in retinal degenerative royal college of surgeons rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 4300 - 4309

**JIANG, L. Q., M. JORQUERA u. J. W. STREILEIN (1993):** Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 3347 - 3354

**JIANG, L. Q., u. J. W. STREILEIN (1990/1991):** Immunologic privilege evoked by histoincompatible intracameral retinal transplants. *Reg. Immunol.* 3, 121 - 130

**JIANG, L. Q., u. J. W. STREILEIN (1992):** Immunity and immune privilege elicited by autoantigens expressed on syngeneic neonatal neural retina grafts. *Curr. Eye Res.* 11, 697 - 709



**JOLLY, D. (1994):** Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 1, 51 - 64

**JORGENSEN, A., A. K. WIENCKE, M. LACOUR, C. G. KOESTEL, H. O. MADSEN, S. HAMANN, G. M. LUI, E. SCHERFIG, J. U. PRAUSE, A. SVEJGAARD, N. ODUM, M. H. NISSEN u. C. RÖPKE (1998):** Human retinal pigment epithelial cell-induced apoptosis in activated T cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1590 – 1599

**KABANOV, A. V. (1999):** Taking polycation gene delivery systems from *in vitro* to *in vivo*. *PSTT.* 2, 365 - 372

**KIM, N. W., M. A. PIATYSZEK, K. R. PROWSE, C. B. HARLEY, M. D. WEST, P. L. HO, G. M. COVIELLO, W. E. WRIGHT, S. L. WEINRICH u. J. W. SHAY (1994):** Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011 - 2014

**KIRCHHOF, B., E. KIRCHHOF, S. J. RYAN, J. F. DIXON, B. E. BARTON u. N. SORGENTE (1989):** Macrophage modulation of retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 227, 60 - 66

**KLEIN, R., B. E. KLEIN u. K. L. LINTON (1992):** Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol.* 99, 933 - 943

**KNECHTLE, S. J., Y. ZHAI u. J. FECHNER (1996):** Gene therapy in transplantation. *Transplant. Immunol.* 4, 257 - 264

**KOHEN, L., V. ENZMANN, F. FAUDE u. P. WIEDEMANN (1997):** Mechanisms of graft rejection in the transplantation of retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 29, 298 - 304

**KUMAKI, N., D. M. ANDERSON, D. COSMAN u. S. KUMAKI (1996):** Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 15, 876 - 882

**LAMBERT, H. M., A. CAPONE, T. M. AABERG, P. STERNBERG, B. A. MANDELL u. P. F. LOPEZ (1992):** Surgical excision of subfoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 113, 257 - 262

**LAVAIL, M. M. (1981):** Photoreceptor characteristics in congenic strains of RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20, 671 - 675

**LAVAIL, M. M., L. LI, J. E. TURNER u. D. YASUMURA (1992):** Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp. Eye Res.* 55, 555 - 562

**LECHLER, R. I., E. SIMPSON u. F. H. BACH (1995):** Major and minor histocompatibility antigens: an introduction. in: F. H. BACH u. H. AUCHINCLOSS (Hrsg.): *Transplantation immunology*. Verlag Wiley-Liss, New York, S. 1 - 34

**LEDLEY, F. D. (1994):** Non-viral gene therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 626 - 636

**LENTSCH, A. B., T. P. SHANLEY, V. SARMA u. P. A. WARD (1997):** In vivo suppression of NF- $\kappa$ B and preservation of I $\kappa$ B $\alpha$  by interleukin-10 and interleukin-13. *J. Clin. Invest.* 100, 2443 - 2448

**LI, L., H. J. SHEEDLO u. J. E. TURNER (1990):** Long-term rescue of photoreceptor cells in the retinas of RCS dystrophic rats by RPE transplants. *Prog. Brain Res.* 82, 179 - 185

**LI, L., u. J. E. TURNER (1988 a):** Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp. Eye Res.* 47, 911 - 917

**LI, L., u. J. E. TURNER (1988 b):** Transplantation of retinal pigment epithelial cells to immature and adult rat hosts: short- and long-term survival characteristics. *Exp. Eye Res.* 47, 771 - 785

**LIMB, G. A., B. C. LITTLE, A. MEAGER, J. A. OGILVIE, R. A. WOLSTENCROFT, W. A. FRANKS, A. H. CHIGNELL u. D. C. DUMONDE (1991):** Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 5, 686 - 693

**LIN, N., W. FAN, H. J. SHEEDLO, J. E. ASCHENBRENNER u. J. E. TURNER (1996):** Photoreceptor repair in response to RPE transplants in RCS rats: outer segment regeneration. *Curr. Eye Res.* 15, 1069 - 1077

**LINGNER, J., T. R. HUGHES, A. SHEVCHENKO, M. MANN, V. LUNDBLAD u. T. R. CECH (1997):** Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561 - 566

**LIVERSIDGE, J., u. J. V. FORRESTER (1992):** Antigen processing and presentation in the eye: a review. *Curr. Eye Res.* 11, 49 - 58

**LIVERSIDGE, J. M., H. F. SEWELL u. J. V. FORRESTER (1988 a):** Human retinal pigment epithelial cells differentially express MHC class II (HLA DP, DR and DQ) antigens in response to *in vitro* stimulation with lymphokine or purified IFN- $\gamma$ . *Clin. Exp. Immunol.* 73, 489 - 494

**LIVERSIDGE, J., H. F. SEWELL, A. W. THOMSON u. J. V. FORRESTER (1988 b):** Lymphokine-induced MHC class II antigen expression on cultured retinal pigment epithelial cells and the influence of cyclosporin A. *Immunology* 63, 313 - 317

**LOPEZ, R., P. GOURAS, H. KJELDBYE, B. SULLIVAN, V. REPPUCCI, M. BRITTIS, F. WAPNER u. E. GOLUBOFF (1989):** Transplanted retinal pigment epithelium modifies the retinal degeneration in the RCS rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 586 - 588

**LUCAS, C., S. WALLICK, B. M. FENDLY, I. FIGARI u. M. A. PALLADINO (1991):** TGF- $\beta$ : a possible autocrine immune regulator. in: *Clinical applications of TGF- $\beta$* . Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 157), S. 98 - 114

**MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP (1982):** Argon laser photocoagulation for senile macular degeneration: results of a randomized clinical trial. *Arch. Ophthalmol.* 100, 912 - 918

**MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP (1986 a):** Recurrent choroidal neovascularization after argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 104, 503 - 512

**MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP (1986 b):** Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy: three-year results from randomized clinical trials. *Arch. Ophthalmol.* 104, 694 - 701

**MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP (1990):** Krypton laser photocoagulation for neovascular lesions of age-related macular degeneration: results of a randomized clinical trial. *Arch. Ophthalmol.* 108, 816 - 824

**MALINOWSKI, K., C. PULLIS, A. P. RAISBECK u. F. T. RAPAPORT (1992):** Modulation of human lymphocyte marker expression by  $\gamma$  irradiation and mitomycin C. *Cell. Immunol.* 143, 368 - 377

**MALTZMAN, B. A., M. N. MULVIHILL u. A. GREENBAUM (1979):** Senile macular degeneration and risk factors: a case-control study group. *Ann. Ophthalmol.* 11, 1197 - 1201

**MARGHERIO, R. R., A. R. MARGHERIO u. M. E. DESANTIS (2000):** Laser treatments with verteporfin therapy and its potential impact on retinal practices. *Retina* 20, 325 - 330

**MICHELS, S., I. BARBAZETTO u. U. SCHMIDT-ERFURTH (2000):** Aderhautveränderungen nach photodynamischer Therapie (PDT): Verlaufsbeobachtungen über 2 Jahre bei 38 Patienten. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 217, 94 - 99

**MOSMANN, T. R. (1983):** Rapid calorimetric assay for cell viability: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55 - 83

**MOSMANN, T. R., u. K. W. MOORE (1991):** The role of IL-10 in crossregulation of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 responses. *Immunol. Today* 12, A49 - A53

**MOTTRAM, P. L., W.-R. HAN, L. J. PURCELL, I. F. MCKENZIE u. W. W. HANCOCK (1995):** Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and Interferon- $\gamma$  in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 59, 559 - 565

**MULLIGAN, R. C. (1993):** The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926 - 932

**NEUMANN, E., M. SCHAEFER-RIDDER, Y. WANG u. P. H. HOFSCHEIDER (1982):** Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1, 841 - 845

**NIEDERKORN, J. Y. (1990):** Immune privilege and immune regulation in the eye. *Adv. Immunol.* 48, 191 - 226

**O,FARRELL, A.-M., Y. LIU, K. W. MOORE u. A. L. MUI (1998):** IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for STAT3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 1006 - 1018

**OSUSKY, R., R. J. DORIO, Y. K. ARORA, S. J. RYAN u. S. M. WALKER (1997):** MHC class II positive retinal pigment epithelial (RPE) cells can function as antigen-presenting cells for microbial superantigen. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 5, 43 - 50

**PENFOLD, P. L., M. C. KILLINGSWORTH u. S. H. SARMS (1986):** Senile macular degeneration: the involvement of giant cells in atrophy of the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27, 364 - 371

**PERCOPO, C. M., J. J. HOOKS, T. SHINOHARA, R. CASPI u. B. DETRICK (1990):** Cytokine-mediated activation of a neuronal retinal resident cell provokes antigen presentation. *J. Immunol.* 145, 4101 - 4107

**PLANCK, S. R., T. T. DANG, D. GRAVES, D. TARA, J. C. ANSELL u. J. T. ROSENBAUM (1992):** Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 78 - 82

**QIN, L., K. D. CHAVIN, Y. DING, J. P. FAVARO, J. E. WOODWARD, J. LIN, H. TAHARA, P. ROBBINSS, A. SHAKED, D. Y. HO, R. M. SAPOLSKY, M. T. LOTZKE u. J. S. BROMBERG (1995):** Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. *Transplantation* 59, 809 - 816

**QIN, L., K. D. CHAVIN, Y. DING, H. TAHARA, J. P. FAVARO, J. E. WOODWARD, T. SUZUKI, P. D. ROBBINS, M. T. LOTZKE u. J. S. BROMBERG (1996):** Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 prolongs murine cardiac allograft survival. *J. Immunol.* 156, 2316 - 2323

**QIN, L., K. D. CHAVIN, Y. DING, J. E. WOODWARD, J. P. FAVARO, J. LIN u. J. S. BROMBERG (1994):** Gene transfer for transplantation. *Ann. Surg.* 220, 508 - 519

**QUANTIN, B., L. D. PERRICAUDET, S. TAJBAKHSI u. J.-L. MANDEL (1992):** Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2581 - 2584

**RAMBHATLA, L, V. ROJAS, C. CHIU u. C. L. ROWE-RENDLEMAN (1999):** Differentiation of telomerase-immortalized human RPE cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, S924

**REGILLO, C. D. (2000):** Update on photodynamic therapy. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 11, 166 - 170

**RODLAND, K. D., L. L. MULDOON u. B. E. MAGUN (1990):** Cellular mechanisms of TGF- $\beta$  action. *J. Invest. Dermatol.* 94, 33S - 40S

**SARKS, S. H., u. J. P. SARKS (1994):** Age-related macular degeneration: atrophic form. in: S. J. Ryan (Hrsg.): *Retina*. Verlag Mosby, St. Louis, Bd. 2, Kapitel 67, S. 1071 - 1102

**SCHMIDT-ERFURTH, U., u. H. LAQUA (2001):** Photodynamische Therapie: Empfehlungen für Indikation und Behandlung. *Ophthalmologe* 98, 216 - 230

**SHEEDLO, H. J., V. GAUR, L. LI, T. D. SEATON, S. STOVALL, K. YAMAGUCHI u. J. E. TURNER (1991):** RPE transplants in animal models of inherited retinal dystrophy and aging. in: R. E. ANDERSON (Hrsg.): *Retinal degenerations*. CRC Press, Boca Raton, S. 337 - 347

**SHEEDLO, H. J., L. LI u. J. E. TURNER (1989):** Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in RPE-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. *Exp. Eye Res.* 48, 841 - 854

**SHENG, Y., P. GOURAS, H. CAO, L. BERGLIN, H. KJELDBYE, R. LOPEZ u. H. ROSSKOTHEN (1995):** Patch transplants of human fetal retinal pigment epithelium in rabbit and monkey retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 381 - 390

**SHIGEKAWA, K., u. W. J. DOWER (1988):** Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6, 742 - 751

**SHINOZAKI, K., H. YAHATA, H. TANJI, T. SAKAGUCHI, H. ITO u. K. DOHI (1999):** Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. *Gene Therapy* 6, 816 - 822

**SINGER, A., u. F. H. BACH (1995):** Allograft immunity: *in vitro* and *in vivo* studies. in: F. H. BACH u. H. AUCHINCLOSS (Hrsg.): *Transplantation immunology*. Verlag Wiley-Liss, New York, S. 105 - 111

**SIPPY, B. D., F. M. HOFMAN, S. HE, R. OSUSKY, S.-J. SHEU, S. M. WALKER, S. J. RYAN u. D. R. HINTON (1995):** SV40-immortalized and primary cultured human retinal pigment epithelial cells share similar patterns of cytokine-receptor expression and cytokine responsiveness. *Curr. Eye Res.* 14, 495 - 503

**SOOTS, A., I. LAUTENSCHLAGER, L. KROGERUS, O. SAARINEN u. J. AHONEN (1998):** An experimental model of chronic renal allograft rejection in the rat using triple drug immunosuppression. *Transplantation* 65, 42 - 46

**STREILEIN, J. W. (1996):** Ocular immune privilege and the faustian dilemma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 1940 - 1950

**STREILEIN, J. W., u. J. Y. NIEDERKORN (1985):** Characterization of the suppressor cell(s) responsible for anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced in BALB/c mice by P815 cells. *J. Immunol.* 134, 1381 - 1387

**STREILEIN, J. W., M. TAKEUCHI u. A. W. TAYLOR (1997):** Immune privilege, T-cell tolerance, and tissue-restricted autoimmunity. *Hum. Immunol.* 52, 138 - 143

**STREILEIN, J. W., G. A. WILBANKS u. S. W. COUSINS (1992):** Immunoregulatory mechanisms of the eye. *J. Neuroimmunol.* 39, 185 - 200

**STUART, S. L. (1999):** Photodynamic therapy with verteporfin is effective for selected patients with neovascular age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 117, 1400 - 1402

**SUZUKI, T., H. TAHARA, S. NARULA, K. W. MOORE, P. D. ROBBINS u. M. T. LOTZE (1995):** Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J. Exp. Med.* 182, 477 - 486

**TAGA, K., H. MOSTOWSKI u. G. TOSATO (1993):** Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 81, 2964 - 2971

**TANG, M. X., C. T. REDEMANN u. F. C. SZOKA (1996) :** *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7, 703 - 714

**TANIHARA, H., M. YOSHIDA, M. MATSUMOTO u. N. YOSHIMURA (1993):** Identification of transforming growth factor- $\beta$  expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 413 - 419

**THE EYE DISEASE CASE-CONTROL STUDY GROUP (1992):** Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 110, 1701 - 1708

**THOMAS, M. A., M. G. GRAND, D. F. WILLIAMS, C. M. LEE, S. R. PESIN u. M. A. LOWE (1992):** Surgical management of subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 99, 952 - 968

**TRAPNELL, B. C., u. M. GORZIGLIA (1994):** Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 617 - 625

**TUYT, L. M., W. H. DOKTER u. E. VELLENGA (1997):** Gene expression, biological effects and clinical aspects of lymphokines. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 26, 175 - 213

**URTTI, A., J. POLANSKY, G. M. LUI u. F. C. SZOKA (2000):** Gene delivery and expression in human retinal pigment epithelial cells: effects of synthetic carriers, serum, extracellular matrix and viral promoters. *J. Drug Target* 7, 413 - 421

**WAHL, S. M., N. MCCARTNEY-FRANCIS u. S. E. MERGENHAGEN (1989):** Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- $\beta$ . *Immunol. Today* 10, 258 - 261

- WANG, P., P. WU, M. I. SIEGEL, R. W. EGAN u. M. M. BILLAH (1995):** Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 9558 - 9563
- WANG, X.-C., C. JOBIN, J. B. ALLEN, W. L. ROBERTS u. G. J. JAFFE (1999):** Suppression of NF- $\kappa$ B-dependent proinflammatory gene expression in human RPE cells by a proteasome inhibitor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 477 - 486
- WATSON, J. D., M. GILMAN, J. WITKOWSKI u. M. ZOLLER (1993):** Übertragung von Genen in Säugerzellen. in: WATSON, J. D., M. GILMAN, J. WITKOWSKI u. M. ZOLLER (Hrsg.): *Rekombinierte DNA*. Verlag Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 195 - 213
- WEBER-NORDT, R. M., J. K. RILEY, A. C. GREENLUND, K. W. MOORE, J. E. DARNELL u. R. D. SCHREIBER (1999):** Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J. Biol. Chem.* 271, 27954 - 27961
- WEI, R., u. G. M. JONAKAIT (1999):** Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J. Neuroimmunol.* 95, 8 - 18
- WELLER, M., P. WIEDEMANN u. K. HEIMANN (1990):** Proliferative vitreoretinopathy – is it anything more than wound healing at the wrong place? *Int. Ophthalmol.* 14, 105 - 117
- WIEDEMANN, P. (1992):** Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 36, 373 - 384
- WILBANKS, G. A., M. MAMMOLENTI u. J. W. STREILEIN (1991):** Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID): eye-derived cells participate in generating blood-borne signals that induce ACAID. *J. Immunol.* 146, 3018 - 3024
- WRIGHT, W. E., u. J. W. SHAY (1995):** Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol.* 5, 293 - 297
- WU, L., u. R. P. MURPHY (1999):** Photodynamic therapy: a new approach to the treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 10, 217 - 220
- YAMAMOTO, S., J. DU, P. GOURAS u. H. KJELDBYE (1993):** Retinal pigment epithelial transplants and retinal function in RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 3968 - 3075
- YEI, S., N. MITTEREDER, S. WERT, J. A. WHITSETT, R. W. WILMOTT u. B. C. TRAPNELL (1994):** *In vivo* evaluation of the safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lung. *Hum. Gene Ther.* 5, 731 - 744
- YSSEL, H., R. DEWAAL MALEFYT, M. G. RONCAROLO, J. S. ABRAMS, R. LAHESMAA, H. SPITS u. J. E. DEVRIES (1992):** IL-10 is produced by subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 149, 2378 - 2384
- ZAKIAN, V. A. (1989):** Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 23, 579 - 604

**ZAVAZAVA, N., M. HALENE, E. WESTPHAL, B. NÖLLE, G. DUNCKER, E. ECKSTEIN, J. HARPRECHT u. W. MÜLLER-RUCHHOLTZ (1991):** Expression of MHC class I and II molecules by cadaver retinal pigment epithelium cells: optimization of post-mortem HLA typing. *Clin. Exp. Immunol.* 84, 163 - 166

**ZINN, K. M., u. J. V. BENJAMIN-HENKIND (1979):** Anatomy of the human retinal pigment epithelium. in: K. M. ZINN (Hrsg.): *The retinal pigment epithelium*. Verlag Harvard Univ. Press, Cambridge, S. 3 - 31

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Müller, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, für die Zusage zur formellen Betreuung dieser Arbeit sowie sein Interesse und die Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Peter Wiedemann, Augenklinik der Universität Leipzig, danke ich für die Ermöglichung zur Durchführung der Arbeiten am Labor der Augenklinik.

Herrn Dr. Leon Kohen, Augenklinik der Universität Leipzig, möchte ich für die Überlassung des Themas, für die Diskussionen und für diverse Anregungen danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Margit Hollborn und Herrn Dr. Volker Enzmann, Labor der Universitäts-Augenklinik Leipzig, für die kompetente wissenschaftliche Betreuung, die sorgfältige Einarbeitung auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Zellbiologie, für die kritische Durchsicht des Manuskripts und vor allem für ihren Optimismus. Zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Enzmann für seinen Einsatz bzgl. der finanziellen Unterstützung des Projektes durch die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) bedanken.

Für das angenehme Arbeitsklima und für die Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei Frau S. Eulitz, Frau G. Müller und den übrigen Mitarbeitern des Labors der Universitäts-Augenklinik Leipzig.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Gertrud und Manfred Poschinger, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglichten und immer vom Gelingen dieser Arbeit überzeugt waren. Meinem Bruder Andreas danke ich für die Hilfe bei Computerfragen. Schließlich danke ich Jörg und meinen Freunden für die dauerhafte moralische Unterstützung.